

**Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin der Philipps-Universität Marburg**

**Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Rudolf Arnold**

**Abteilung für Hämatologie, Onkologie und Immunologie**

**ehemaliger Leiter: Prof. Dr. Klaus Havemann**

**Leiter: Prof. Dr. Andreas Neubauer**

---

**Zur In-vitro-Aktivierung des Prokathepsin L aus der  
Nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom-Zelllinie EPLC 32 M 1 durch die  
Serinproteasen Humane Leukozyten-Elastase und Prostata-  
Spezifisches-Antigen**

**Inaugural-Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der

Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

**Klaus Weber**

aus Marburg

Marburg 2001

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin  
der Philipps-Universität Marburg am .....  
gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof.Dr. ....

Referent: Prof.Dr. ....

Correferent: Prof.Dr. ....

**In Liebe und Dankbarkeit meinen Eltern  
Bärbel und Johannes Weber  
gewidmet**

## INHALTSVERZEICHNIS

### EINLEITUNG

1	DAS BRONCHIALKARZINOM	8
1.1	Epidemiologie	8
1.2	Ätiologie	8
1.3	Pathohistologische Klassifikation	9
1.4	Screening, Klinik, Diagnose, Tumormarker	10
1.5	Staging	11
1.6	Therapeutische Optionen, Resultate, Prognose	12
1.6.1	NSCLC	12
1.6.2	SCLC	13
1.7	Zusammenfassung der klinischen Gesamtsituation beim Bronchialkarzinom	13
2	ZELLINIEN NICHTKLEINZELLIGER BRONCHIALKARZINOME	14
2.1	Tumorzelllinien als Modell	14
2.2	Charakteristika plattenepithelialer NSCLC-Tumorzelllinien in Marburg	14
2.3	Zelldifferenzierung unter dem Einfluß von Phorbolester	16
2.4	Änderung der Charakteristika plattenepithelialer NSCLC-Tumorzelllinien in Marburg unter dem Einfluß des Tumorpromotors PMA	17
3	METASTASIERUNG UND INVASIVITÄT	17
3.1	Formalpathogenese der Metastasierung	17
3.1.1	Proliferation und Angiogenese	17
3.1.2	Motilität	18
3.1.3	Invasion	18
3.1.3.1	Attachment: Kontaktaufnahme zwischen Tumorzelle und Basalmembra	18
3.1.3.2	Dissolution: proteolytische Degradation der Basalmembran	19
3.1.3.3	Locomotion: chemotaktisch aktivierte Migration durch die Basalmembran	19
3.2	Bronchialkarzinome, Proteasen und Metastasierung	19
4	KATHEPSIN L	20
4.1	Einführung in die papainartigen Kathepsine	20
4.1.1	Kathepsin L in der Systematik der Endopeptidasen	20
4.1.2	Grundcharakteristika der Kathepsine vom Papaintyp	20

4.1.3	Aminosäuresequenz und katalytischer Mechanismus papainartiger Kathepsine	21
4.1.4	Funktion papainartiger Kathepsine	22
4.1.5	Synthese und intrazellulärer Transport lysosomaler Kathepsine	22
4.2	Charakteristika von (Pro-)Kathepsin L	23
4.2.1	Genetik und Proteinbiosynthese	23
4.2.2	Substrate	23
4.3	Prokathepsin L und Kathepsin L bei malignen Tumoren	24
4.3.1	Überblick	24
4.3.2	Regulation der Prokathepsin-L-Expression maligner Zellen In-Vitro	24
4.3.3	Prokathepsin L-Aktivierungsmechanismen	24
4.3.3.1	pH-abhängige Aktivierung von Prokathepsin L	25
4.3.3.2	Autoaktivierung von Prokathepsin L durch aktives Kathepsin L	25
4.3.3.3	proteolytische Aktivierung von Prokathepsin L durch andere Proteasen	25
5	AUFGABENSTELLUNG	26

## **MATERIAL UND METHODEN**

6	ÜBERSICHT ÜBER DIE VERWENDETEN REAGENZIEN	27
7	ZUBEREITUNG DER MEDIEN, LÖSUNGEN UND PUFFER	28
7.1	Zellkultur, Expansion und Wannenstapel	28
7.2	fluorometrische Kathepsin L-Assays: Puffer und Assaylösungen	29
7.3	Puffer und Lösungen für die Aufreinigung des konditionierten Mediums	30
7.4	Puffer und Lösungen für die Gelelektrophorese und den Western Immunoblot	30
8	ZELLKULTUR	31
8.1	Haltung der Stammkultur, Passagieren und Expansion	32
8.2	Gewinnung großer Mengen konditionierten Mediums per Wannenstapeltechnik	32
9	GEWINNUNG VON PKatL AUS KONDITIONIERTEM MEDIUM	32
9.1	Evaluation des Reinigungserfolges	33
9.1.1	Bestimmung der Proteinkonzentration	33
9.1.2	Fluorometrische Assays zur Kathepsin L-Aktivitätsmessung	33
9.1.2.1	KatL-Assay pH 3,0	33
9.1.2.2	KatL-Assay pH 3,0/5,5	34

9.1.3	Qualitativer Nachweis von Prokathepsin L im Western Blot	34
9.1.3.1	Gelelektrophorese per SDS-PAGE	35
9.1.3.2	Western Immunoblot des Elektrophoresegels	35
9.2	Affinitätschromatographie	36
9.3	Membranfiltration	36
9.4	Proteingrößenbezogene Gelfiltration	36
9.5	Dialyse	37
9.6	Anionenaustauscherchromatographie und abschließende Membranfiltration	37
9.7	Darstellung der Pipettierschemata der In-vitro-Aktivierungsversuche	37
10	GEWINNUNG VON PSA (PROSTATA-SPEZIFISCHES-ANTIGEN)	37
10.1	Durchführung der Arbeiten und Herkunft des Ausgangsmaterial	37
10.2	Ablauf der Reinigung	38
11	PKatL OHNE UND MIT ENZYMEN IM AKTIVIERUNGSASSAY	38
11.1	Optimierung der In-vitro-Aktivierung von Prokathepsin L ohne weitere Enzyme	39
11.2	Optimierung der In-vitro-Aktivierung von Prokathepsin L mit HLE	39

## ERGEBNISSE

12	AUFREINIGUNG DES KONDITIONIERTEN MEDIUMS	41
12.1	Quantitative Veränderungen der Probe im Aufreinigungsprozeß	41
12.2	Meßergebnisse der Gelfiltration	45
12.3	Evaluation der Reinheit der Endprobe in SDS-PAGE und Western Immunoblot	47
13	PKatL OHNE UND MIT ENZYMEN IN AKTIVIERUNGSASSAY UND BLOT	50
13.1	Ergebnisse der Optimierung der In-Vitro-Aktivierung von Prokathepsin L	50
13.2	Ergebnisse der Optimierung der In-Vitro-Aktivierung von PKatL mit HLE	53
13.3	Ergebnisse der In-vitro-Aktivierungsversuche von PKatL mit PSA	57
13.4	Western Immunoblots der Verdauansätze von PKatL mit HLE und PKatL mit PSA	58

<b>DISKUSSION</b>	
14 Proteolytische Aktivierung von KatL	63
14.1 Übersicht über die Ergebnisse der HLE-abhängigen PKatL-Aktivierung	63
14.1.1 Würdigung und Kritik der Vorarbeiten – Konsequenzen für die vorliegende Arbeit	64
14.1.2 Methodische Probleme beim Nachweis einer PSA-abhängigen PKatL-Aktivierung	66
14.2 Denkmodelle zur extrazellulär-proteolytischen PKatL-Aktivierung	67
<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	71
<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	73
<b>TABELLENVERZEICHNIS</b>	88
<b>DIAGRAMMVERZEICHNIS</b>	90
<b>PHOTOVERZEICHNIS</b>	91
<b>VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER UND LEHRERINNEN</b>	92
<b>DANKSAGUNG</b>	93
<b>LEBENS LAUF</b>	94
<b>ERKLÄRUNG</b>	96

# **EINLEITUNG**

## **1 DAS BRONCHIALKARZINOM**

### **1.1 Epidemiologie**

Das Bronchialkarzinom ist in Deutschland der häufigste bösartige Tumor bei Männern und bei Frauen steht es inzwischen an vierter Stelle der malignen Erkrankungen (Statistisches Bundesamt 1988). Die zeitliche Entwicklung bei den Geschlechtern ist jedoch gegenläufig, da sich die Sterblichkeit bei den Männern seit den Achtziger Jahren auf hohem Niveau stabilisiert (nach kontinuierlichem Anstieg in den vorhergehenden drei Jahrzehnten), wohingegen sie bei Frauen noch immer steigt (Becker/Wahrendorf 1998). Insgesamt verstarben 1992 in Deutschland 35239 Menschen an Bronchialkarzinomen, was 3,5% aller Todesfälle entsprach (Todesursachenstatistik gemäß ICD). Aus Autopsiestudien kann auf eine deutlich höher als 100/100.000 liegende Mortalität geschlossen werden (Noltenius 1987). Die Inzidenz wird in Deutschland mit etwa 70/100.000 für Männer und 10/100.000 für Frauen angegeben (Brenner/Ziegler 1992). Im Vergleich schwankt sie nach Geschlecht, Alter, Rasse und Staat: so liegt die Inzidenz in den USA bei 100/100.000 Erkrankungen für männliche Schwarze (Blot 1992) und unter der Bevölkerung des Senegals bei 1/100.000 (Becker/Wahrendorf 1998). Historisch gesehen erlangt das Bronchialkarzinom erst in unserem Jahrhundert epidemiologische Bedeutung, die vorher geringe Mortalität steigt seit den Zwanziger Jahren kontinuierlich an und folgt der rasanten Zunahme des Tabakkonsums in den industrialisierten Nationen (Carr 1991). In nur 30 Jahren setzte sich das Bronchialkarzinom an die Spitze der Todesursachen durch Krebs bei Männern und hat seither diese Position inne. In den USA steht die Erkrankung seit 15 Jahren auch bei Frauen an erster Stelle der Todesursachen durch Krebs (Scoggin 1992).

### **1.2 Ätiologie**

Hauptverursacher des Lungenkrebs ist Tabakkonsum durch Zigarettenrauchen. Dies wurde erstmals in den Zwanziger Jahren vermutet (Tylecote 1927), aber erst durch einen Bericht des Untersuchungsausschusses der US-Bundesregierung aus dem Jahre 1964 (U.S. Government Printing Office 1964) anerkannt. Der Bericht änderte die Rauchgewohnheiten in den USA, so rauchte bis 1964 jeder zweite Mann (Carr 1991), aber 20 Jahre später waren es nur noch 29% (CDC 1991). Der Anteil der Raucherinnen fiel von 34% im Jahre 1964 auf 25% 1987 (Carr 1991). Diese Entwicklung wirkte sich 25 Jahre später in den epidemiologischen Ziffern aus: Mortalität und Inzidenz erreichten Mitte der Achtziger Jahre ein Plateau. Aufgrund des zeitlich



versetzten Verlaufs der Rauchgewohnheiten der US-amerikanischen Frauen findet sich hier ein relativ kleinerer Rückgang der Inzidenz von etwa 5-10% (Devesa et al. 1989). Bis zum Jahr 2000 prognostizierte man für die USA einen Rückgang der rauchenden Bevölkerung auf weniger als 15%, was auf aggressive Anti-Rauchen-Kampagnen zurückgeführt wird. Der Zigarettenkonsum ist aber weltweit (insbesondere in der sogenannten Dritten Welt) auf dem Vormarsch. Es kann davon ausgegangen werden, daß die Inzidenz weltweit noch zunimmt.

Aktives Rauchen ist für etwa 95% der männlichen und 85% der weiblichen Bronchialkarzinome verantwortlich (Noltenius 1987, Lin/Ihde 1992). Die Inzidenz liegt bei rauchenden Personen um den Faktor 100 über der von nichtrauchenden, hierbei steigt das Erkrankungsrisiko exponentiell mit der lebenslang konsumierten Zigarettenzahl (Doll/Hill 1964, Vutug/Kunze 1982). Beeindruckend ist die Risikominderung, die sich bei Beendigung des Nikotinabusus einstellt: das Erkrankungsrisiko fällt in zehn Jahren auf 30-50% des Risikos einer weiterrrauchenden Person (CDC 1991). Ein wichtiger Aspekt, der erst in den letzten Jahren gewürdigt wird, ist das Passivrauchen. Es gilt als erwiesen, daß Passivrauchen das Erkrankungsrisiko erhöht (Rylander 1991, Kabat 1996), denn der inhalierte Nebenstromrauch enthält eine höhere Karzinogenkonzentration als der Hauptstromrauch (Scoggin 1992). Darüber hinaus erhöht es das Risiko anderer Malignome (Ernster 1988, Engeland et al 1996/1997). Für Herz-Kreislauf-Erkrankungen ist Tabak als Hauptrisikofaktor ebenfalls etabliert (Tresch/Aronow 1996), wobei auch hier Passivrauchen zunehmend ins Blickfeld gerät (Wells 1998).

Neben dem Zigarettenkonsum finden sich weitere Ursachen des Bronchialkarzinoms, die von sekundärer epidemiologischer Bedeutung sind. Für die folgenden Stoffe sind kausale Beziehungen zur Bronchialkarzinogenese nachgewiesen (Blot 1984, Bailey 1984): Arsen, Asbest, Bichlormethyläther, Chrom, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe, Nickel, Uran, Radon und Senfgas. Es existieren noch weitere Stoffe, die als (Ko-)Karzinogene gelten. Der Effekt kombinierter Karzinogene zeigt sich beim Asbest, da chronische Exposition das Erkrankungsrisiko bei nicht rauchenden Personen um den Faktor 4-5 und bei Rauchern um den Faktor 80-90 erhöht (Fishman 1988). Im Bereich der Ernährung spielt der Alkoholkonsum als Zusatzfaktor eine wichtige Rolle (Reif/Heeren 1999). Wie bei vielen anderen Erkrankungen scheinen genetische Determinanten auch beim Lungenkrebs die individuelle Disposition zu beeinflussen (Mulvihill/Bale 1984, Carmelli et al. 1992).

### **1.3 Pathohistologische Klassifikation**

Die Einteilung der Lungentumore erfolgt gemäß der WHO-Klassifikation aus dem Jahr 1982 (World Health Organization 1982).

**1      Tabelle 1.1      WHO-Klassifikation der Lungentumore**

I EPITHELIALE TUMOREN	IV VERSCHIEDENE TUMOREN
A benigne Tumoren	A benigne Tumoren
1 Papillome	B maligne Tumoren
2 Adenome	1 Karzinosarkom
B Dysplasien, Carcinoma in situ	2 pulmonales Blastom
C maligne Tumoren	3 maligne Melanome
1 Plattenepithel-Karzinom	4 maligne Lymphome
2 kleinzellige Karzinome	5 Andere
3 Adenokarzinom	V METASTASEN
4 großzellige Karzinome	VI unklassifizierte Tumoren
5 Adenosquamöses Karzinom	VII tumorähnliche Läsionen
6 Karzinoid	A Hamartome
7 Bronchialdrüsen-Karzinom	B lymphoproliferative Läsionen
8 andere	C „Tumorlet“
II „SOFT-TISSUE“-TUMOREN	D eosinophiles Granulom
III MESOTHELIALE TUMOREN	E „sklerosierendes Hämangiom“
A benignes Mesotheliom	F inflammatorischer Pseudotumor
B malignes Mesotheliom	G Andere

Danach bezeichnen die Synonyma Lungenkrebs/Bronchialkarzinom die primären, malignen Tumoren der Bronchial- und Alveolarepithelien - sie machen den überwiegenden Teil aller Lungentumore aus. Innerhalb der malignen Tumore finden sich die Nicht-Kleinzeller (Non-small cell lung cancer, NSCLC) in fast drei Viertel der Fälle (75,8%), gefolgt von den kleinzelligen Karzinomen (Small-cell lung cancer, SCLC, 21,1%), alle anderen Formen machen nur 3,1% aus. Die Einteilung gründet auf der ähnlichen Biologie der unter NSCLC subsummierten Tumoren im Gegensatz zu den SCLC. Bei NSCLC betragen die histologischen Anteile für das Plattenepithelkarzinom 75,7 %, für das Adenokarzinom 27,9% und bei großzelligen Karzinomen 12,2% (Schalhorn/ Sunder-Plassmann 1994). Allerdings muß beachtet werden, daß in etwa zehn Prozent aller Karzinome Kombinationen mehrerer histologischer Typen gefunden werden. Dies führt zur Variationsbreite der relativen Häufigkeitsangaben in der Literatur (Scoggin 1992).

#### **1.4      Screening, Klinik, Diagnose, Tumormarker**

Bisher existiert kein Screeningverfahren, das die Sterblichkeit der Erkrankung verringert. Röntgen-Thoraxaufnahmen und Sputumzytologie gelten als akzeptable Verfahren für Hochrisikogruppen wie langjährige Raucher. Bei dieser selektierten Kohorte konnten Vorteile

in bezug auf Zeitpunkt der Diagnosestellung, Resektabilität und Überlebensdauer gezeigt werden. Diese werden aber durch fehlende Senkung der Letalität stark relativiert (Fontana et al 1991), da die krankheitsspezifische Sterblichkeit als Parameter der Effektivität der Screeningmethode etabliert ist (Strauss 1997). Zusammenfassend wird der Wert des Screening skeptisch beurteilt (Cuzick 1999) - unter 50 Jahren kann es aufgrund mangelndem Erfolg nicht, bei älteren Menschen nur bedingt empfohlen werden (Maeno et al. 1998). Klinisch finden sich auch in fortgeschrittenen Stadien meist nur unspezifische Symptome wie Kachexie, und Kräfteverfall. Lediglich der seltenere Pancoast-Tumor führt durch den charakteristischen Horner'schen Symptomenkomplex rasch zur Diagnose. Insgesamt ist die Klinik ohne Einfluß auf die Prognose (Niederle et al 1993).

Die Diagnosefindung verläuft zweistufig. Die Verdachtsdiagnose wird meist aufgrund eines Röntgenbefundes gestellt: bei Erwachsenen ist ein pulmonaler Rundherd immer verdächtig auf ein Karzinom. Die Abklärung erfolgt über die Lokalisationsdiagnostik per CT-Thorax, woraufhin eine Bronchoskopie zur Gewebebegewinnung durchgeführt wird. Die Sicherung der Verdachtsdiagnose erfolgt dann wie bei allen Malignomen histologisch. Bei (wiederholt) unklaren Befunden kann eine Mediastinoskopie zur sicheren Materialgewinnung notwendig sein (Steppling/Ferlinz 1994). Tumormarker spielen eine Rolle zur Verlaufskontrolle und Prognoseeinschätzung: das karzinoembryonale Antigen (CEA) weist mit steigender Höhe eine gesicherte Korrelation zum Tumorstadium auf und die Neuronen-spezifische Enolase (NSE) gilt als typischer Marker des SCLC, wobei die Sensitivität im höheren Tumorstadium um 90% liegt (Lamerz et al 1983). Für Plattenepithelkarzinome stehen das Squamous Cell Carcinoma Antigen (SCCA) und als neuerer, sensiblerer Marker CYFRA-21.1 zur Verfügung (Pastor et al 1997).

## 1.5 Staging

Die Ausdehnung der Erkrankung muß prätherapeutisch festgestellt werden. Das Staging geschieht zur Prognoseeinschätzung, Festlegung des Therapieregimes und Vergleichbarkeit der Ergebnisse (Woll/Thatcher 1996). Hierbei muß einerseits die lokale Tumorausdehnung bestimmt werden, andererseits sollen Fernmetastasen erfaßt werden. Als Standard werden ein CT-Schädel, ein CT-Abdomen, eine sonographische Darstellung der Bauchorgane sowie eine Knochenszintigraphie gefordert (Steppling/Ferlinz 1994). Die Staginginteilung erfolgt beim NSCLC nach dem TNM-System (UICC 1987), das subsummierend in die Tumorstadien 0 (= Carcinoma in situ) bis IV (jedes Stadium mit Fernmetastasen) einteilt (Mountain 1986). Die Einteilung des SCLC erfolgt in die Schweregrade „limited disease“ (LD, alle nicht-fernmastasierten Stadien 0-III nach TNM) und „extensive disease“ (ED, mit Nachweis von Fernmetastasen, IV nach TNM [Stahel et al 1989]).

## 1.6 Therapeutische Optionen, Resultate, Prognose

### 1.6.1 NSCLC

Die chirurgische Resektion ist in den Stadien I-II die anzustrebende Methode, die Resektabilität hängt dabei von Tumorstadium und Allgemeinzustand des Patienten ab. In den letzten Jahren wurde die OP auch im Stadium IIIa mit neoadjuvanten Polychemotherapien kombiniert, wobei der Nutzen derzeit noch umstritten ist. In Großbritannien sind 65% der Patienten bei Diagnose inoperabel und weitere 15% inresektabel. Von den kurativ operierten verbleibenden 20% sind nach fünf Jahren 25-30% und nach zehn Jahren etwa 16-18% am Leben. Hauptgrund für das Therapieversagen ist nur in einem Viertel eine lokales, aber in drei Viertel ein metastatisches Rezidiv (Mulshine et al 1986). Aus diesem Grund versucht man wie bei den SCLC prognostische Marker zu identifizieren, die eine Eingruppierung mit exakt angepaßter Therapie ermöglichen (Übersicht bei Strauss 1997). Bestrahlung mit kurativer Zielsetzung kommt nur für wenige Patienten in Frage, die trotz niedrigem Tumorstadium nicht operabel sind. Schemata mit hyperfraktioniertem Vorgehen erreichen 5-Jahres-Überlebensraten um 10% (Übersicht bei Woll/Thatcher 1996). Einen festen Platz nimmt die Bestrahlung unter palliativer Zielsetzung ein, wenn z.B. Schmerzen oder Hämoptysen durch lokales Tumorwachstum auftreten. Die Chemotherapie ist die Methode der Wahl bei primär nicht-operablen oder -resektablen Patienten, wobei die Überlebensrate meist unter einem Jahr liegt. Problematisch ist die geringe Anzahl an Therapeutika, die relevante Ansprechraten aufweisen (z.B. Ifosfamid, Cisplatin, Mitomycin C), wobei signifikante Unterschiede zwischen den Therapieschemata (Monotherapie/Kombination) kaum bestehen (Woll/Thatcher 1996, Splinter 1991). Inwieweit die positiven Effekte von neuen Substanzen wie Gemcitabin bei gastrointestinalen Tumoren auch bei NSCLC reproduzierbar sind, ist Gegenstand der Forschung (Steward 1998).

### 2 Tabelle 1.2 Stadienabhängige Therapiestrategien beim NSCLC

Stadium	Therapie	Prognose (5-JÜR, MÜZ)
I	Operation (+ neoadjuvante Chemotherapie?)	> 50%
II		30-35%
IIIa		10-20%
IIIb	Operation	10%
	Bestrahlung mit kurativem Ansatz	18 Monate
	Bestrahlung mit palliativem Ansatz	Wenige Monate
	Kombinationstherapie (OP + Chemotherapie, Radiochemotherapie)	Fraglich verlängerte MÜZ

IV	Polychemotherapie	5-20%
----	-------------------	-------

Prozentangaben: 5-Jahres-Überlebensrate (5-JÜR), Monatsangaben: mediane Überlebenszeit (MÜZ). Nach Woll/Thatcher 1996, Schalhorn/Sunder-Plassmann 1994, Niederle et al 1993, Scoggin 1992

### 1.6.2 SCLC

Aufgrund der frühen (vor allem extrathorakalen) Metastasierung sind SCLC lokal orientierten Verfahren wie Operation oder Bestrahlung meist nicht zugänglich. Daher ist die Polychemotherapie als systemischer Ansatz Methode der Wahl.

**Tabelle 1.3 Stadienabhängige Resultate unterschiedlicher Therapiestrategien beim SCLC**

Therapie	MÜZ		2-3-JÜR	
	LD	ED	LD	ED
Palliativ	3	1,5	/	/
Chirurgie	5-6	/	4-5	/
Radiatio	3-9	/	2-7	/
Monochemo	6	4	/	/
Polychemo	10-14	7-11	5-15	1-3
Polychemo + Radiatio	12-16	7-11	10-25	1-2

MÜZ: mediane Überlebenszeit in Monaten, 2-3-JÜR: 2-3-Jahres-Überlebensrate in Prozent, LD: limited disease, ED: extensive disease (nach Minna et al 1989).

Chemotherapeutisch kommen Ifosfamid, Cisplatin, Etoposid, Cyclophosphamid, Carboplatin und Doxorubicin (Klastersky/Sculier 1989) zum Einsatz. ED-Patienten haben nach wie vor eine schlechte Prognose, so daß sie meist nur palliativ behandelt werden können. Hier sind die Bestrebungen auf eine exakteres Staging gerichtet, damit potentiell kurable Patienten identifiziert und aggressiv behandelt werden können (Übersicht bei Rawson/Peto 1990). Die Bestrahlung kommt palliativ und bei primär kurativen Ansätzen zur Rezidivprophylaxe (als Schädelbestrahlung) zum Einsatz, operatives Vorgehen ist nur bei gesichert lokalem Geschehen indiziert - bei Resektabilität kann eine 5-JÜR von 40% erreicht werden. Allerdings sind die Fallzahlen der Studien klein und erreichen keine statistische Signifikanz (Woll/Thatcher 1996).

## 1.7 Zusammenfassung der klinischen Gesamtsituation beim Bronchialkarzinom

Es steht außer Zweifel, daß der Schlüssel zur Behandlung des Bronchialkarzinoms die Primärprävention ist: die Verringerung des Tabakkonsums ist der entscheidende Schritt (zur Vermeidung auch vieler anderer Krebserkrankungen). Hinweise auf ein Umdenken zeigen sich derzeit in den USA, wo sich große Tabakkonzerne horrenden Zivilklagen von Bundesstaaten

und Zentralregierung ausgesetzt sehen, die die Unbekümmertheit bezüglich ihrer gesundheitlichen Verantwortung empfindlich stören werden. Zudem zeigen epidemiologische Trends für die Neunziger Jahre einen geringen Rückgang der Inzidenz der Bronchialkarzinome in den USA (-0,9%/Jahr 1990-1996, -0,6%/Jahr Lungenkrebstote 1990-1996, Wingo et al 1999). Aufgrund des zeitlichen Versatzes der Rauchgewohnheiten von Männern und Frauen kann von Entwarnung jedoch keine Rede sein, da Inzidenz und Mortalität bei Frauen weiterhin ansteigen (Travis 1996). In Anbetracht der zögerlichen Verbesserung der Primärprävention sowie der geringen Verbesserung der Überlebensrate unter Therapie (Erhöhung der medianen Überlebenszeit 1975-1989 von fünf auf zehn Monate ohne signifikante Verbesserung der 3-JÜR, Janssen-Heijnen 1998) ist Optimismus nicht angebracht. Der Lungenkrebs wird aufgrund der Latenz zwischen Beginn des Tabakkonsums und Erkrankungsbeginn noch für Jahrzehnte eines der bedeutendsten onkologischen, epidemiologischen und ökonomischen Gesundheitsprobleme bleiben.

## **2 ZELLINIEN NICHTKLEINZELLIGER BRONCHIALKARZINOME**

### **2.3 Tumorzelllinien als Modell**

Permanent kultivierbare Tumorzelllinien sind eine wesentliche Voraussetzung zur Erforschung tumorbiologischer Fragen. Durch Kultivierung von Lungenkrebszellen können neue Erkenntnisse über das biologische Verhalten von NSCLC und SCLC gewonnen werden (Gazdar 1986), die (z.B. zunächst über ein Tiermodell) zu einer risikoarmen klinischen Forschung am kranken Menschen beitragen. Allerdings muß bedacht werden, daß Zelllinien in Kultur eine im Vergleich zum Tumor undifferenziertere Biologie aufweisen. Dies wird auf Selektion undifferenzierterer Zellen unter Kulturbedingungen zurückgeführt (Bepler et al 1988). In der Abteilung für Hämatologie/Onkologie des Zentrums für Innere Medizin der Philipps-Universität Marburg wurden seit Mitte der Achtziger Jahre NSCLC- und SCLC-Zelllinien etabliert (Bepler et al 1987). Neben Linien aus großzelligen Karzinomen und einem Adenokarzinom waren dies auch die Plattenepithelkarzinomlinien EPLC-32M1 und EPLC-65H (Bepler et al 1988), deren Proliferations- und Differenzierungsverhalten weitergehend charakterisiert wurde (Salge et al 1990, Kilian et al 1993).

### **2.2 Charakteristika plattenepithelialer NSCLC-Tumorzelllinien in Marburg**

Neben den in Marburg selbst etablierten Linien (Bepler et al 1987/1988) waren auch weitere Nichtkleinzeller in Kultur vorhanden (Bergh et al 1981/1985, Brower et al 1986), deren Differenzierungsgrad unter In-vitro-Bedingungen evaluiert wurde.

### 3      **Tabelle 2.1 Differenzierungsmarker von NSCLC-Tumorzelllinien**

Marker	Verhalten des Markers bei eher		Literatur
	undifferenzierten Zellen	differenzierten Zellen	
Kinetik	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Schnelles Zellwachstum</li> <li>• Kurze Verdopplungszeiten</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Langsames Zellwachstum</li> <li>• Lange Verdopplungszeiten</li> </ul>	Salge et al 1990 Kitten et al 1982
Effizienz <sup>1</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hohe Wachstumsrate</li> <li>• Gute plating efficiency<sup>2</sup></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Niedrige Wachstumsrate</li> <li>• Niedrige plating efficiency</li> </ul>	Kitten et al 1982 Carney et al 1980
Adhäsion	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adhärent wachsend</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Abnehmende Adhärenz</li> </ul>	Salge et al 1990
Involucrin <sup>3</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kaum Aktivität vorhanden</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aktivität vorhanden</li> </ul>	Said et al 1983 Watt 1983 Walts et al 1985
Transglutaminase <sup>3</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kaum Aktivität vorhanden</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aktivität vorhanden</li> </ul>	Peterson et al 1983 Thacher/Rice 1985 Banks-Schlegel et al 1985
Cornified Envelopes <sup>3</sup>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kaum Aktivität vorhanden</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aktivität vorhanden</li> </ul>	Yuspa et al 1983 Levitt et al 1990

1: Effizienz im Soft-Agar-Cloning (Hamburger/Salmon 1977)

2: Anzahl gebildeter Kolonien im Verhältnis zur Anzahl der ausgebrachten Zellen pro Agarplatte

3: bedeutsamer Marker für den Differenzierungsgrad plattenepithelialer Zelllinien (Jetten et al 1989)

Die auf einen hohen Differenzierungsgrad hinweisenden Parameter sind bei den Marburger Zelllinien nur gering nachweisbar, was für eine relative Undifferenziertheit spricht (Bepler et al 1988). Zusammenfassend weisen die plattenepithelialen Tumorzelllinien recht einheitliche Charakteristika auf, die mit den angegebenen Parametern übereinstimmen.

### 4      **Tabelle 2.2 Charakteristika von Marburger plattenepithelialen NSCLC-Tumorzelllinien**

Charakteristikum	Zelllinien (Bepler et al 1988)	
	EPLC 32M1	EPLC 65H
Histologie des Primärtumors	Plattenepithelkarzinom	Plattenepithelkarzinom
Grading des Primärtumors	Mäßig differenziert	Wenig differenziert
Herkunft der Zelllinie	Maus-Xenograft (Passage 15)	Lymphknotenmetastase
Grading des Xenografts	Undifferenziert	Undifferenziert

Morphologie der Einzelzelle	Epitheloid, leicht elongiert	Epitheloid, polygonal
Kerne	1	1
Nukleolen	$\geq 2$	$\geq 2$
Wachstum in der Zellkultur	Adhärenter Monolayer, kopfsteinpflasterartig	Adhärenter Monolayer, kopfsteinpflasterartig
Populationsverdopplungszeit	16 h	19 h
Sättigungsdichte im Medium	500000/ml	500000/ml
Effizienz im Soft-Agar-Cloning	++	++
PAS-Färbung	/	/
Acian-blue-reaction	/	/

### 2.3 Zelldifferenzierung unter dem Einfluß von Phorbolestern

Phorbolster sind polyzyklische Alkoholderivate des Crotonöl. Das in Marburg zu Proliferations- und Differenzierungszwecken verwendete Analogon ist Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA). Phorbolster sind Tumorpromotoren und entfalten ihre Wirkung über eine Aktivierung der Proteinkinase C (Nishizuka 1984, Castagna et al 1982) durch ihre strukturelle Ähnlichkeit zum physiologischen Aktivator Diacylglycerol (Stryer 1991). Die second messenger Diacylglycerol und Inositol-1,4,5-trisphosphat ( $IP_3$ , Berridge 1987) entstehen durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindung von Phospholipiden der Plasmamembran, Substrat ist Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ( $PIP_2$ , Nishizuka 1984, Hirasawa/Nishizuka 1985). Diacylglycerol aktiviert Proteinkinase C über die Erhöhung der  $Ca^{2+}$ -Affinität des Enzyms, so daß die Kinase schon bei physiologisch-cytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen aktiv wird (Nishizuka 1986). Das 77-kD-Enzym phosphoryliert Serin- und Threoninreste der Zielproteine, wodurch sowohl aktivierende als auch inhibierende Effekte bedingt sind. Diese betreffen neben dem Stoffwechsel (z.B. Glykogensynthese) vor allem Wachstums- und Differenzierungsstimuli. Die Phorbolster-induzierte Proliferation und Differenzierung von Zellen unterliegt im Gegensatz zur Diacylglycerol-abhängigen nicht der Regulation durch zyklische Nukleotide (Yamanishi et al 1983) und führt schon bei 1000fach geringerer Konzentration als Diacylglycerol zu einer persistierenden, maximalen Aktivierung, da das Stimulans physiologischerweise nicht abgebaut werden kann (Nishizuka 1984). Dies bedingt maßgeblich den karzinogenen Effekt auf primär benigne Zellen (Parkinson/Emmerson 1982, Stanley et al 1985).



## 2.4 Änderung der Charakteristika plattenepithelialer NSCLC-Tumorzelllinien in Marburg unter dem Einfluß des Tumorpromotors PMA

Salge et al untersuchten den Einfluß des Tumorpromotors PMA auf die Veränderungen des Differenzierungsgrades der NSCLC-Linien (Salge et al 1990). Die Änderungen im biologischen Verhalten können als Ausdruck einer initialen Undifferenziertheit gesehen werden: Eigenschaften undifferenzierter Zellen wie Adhäsivität und hohe Proliferationsrate ließen nach, während Differenzierungsmarker wie cornified envelopes verstärkt nachweisbar wurden.

### 5 Tabelle 2.3 Differenzierungsmarker Marburger NSCLC-Zelllinien nach PMA-Exposition

Marker	Veränderung nach PMA-Exposition	
	EPLC 32M1	EPLC 65H
Kinetik	↓↓	↓↓
Effizienz	↓	↓
Adhäsion	↓	↓
Involucrin	↔	↔
Transglutaminase	↑↑	↑↑
Cornified Envelopes	↑↑	↑↑

## 3 METASTASIERUNG UND INVASIVITÄT

### 3.2 Formalpathogenese der Metastasierung

Metastasierung bedeutet die Bildung von Tochtergeschwülsten ausgehend vom Primärtumor, die unabhängig proliferieren (Müller-Hermelink/Müller 1994) und ist der Hauptgrund für Therapieversagen und Sterblichkeit bei Krebserkrankungen (Dudjak 1992). Daher ist der Schritt von der lokalen zur systemischen Erkrankung prognoseentscheidend.

Der Metastastasierungsprozeß läßt sich in zahlreiche Schritte zerlegen. Die dafür notwendigen Fähigkeiten werden durch Adaptations- und Selektionsprozesse erworben und gehen mit einem fortschreitenden Verlust an Differenziertheit einher (Kerbel 1992). Es entwickeln sich Klone mit divergierenden Eigenschaften, nur die über alle notwendigen Eigenschaften verfügenden Zellen können sich metastatisch absiedeln (Fidler 1978, Tarin 1996).

#### 3.1.1 Proliferation und Angiogenese

Maligne Transformation führt zur Imbalance der regulatorischen Prozesse des Zellzyklus: der steady-state zwischen Zellproduktion und Zelltod ist aufgehoben und es resultieren gesteigerte

Zellteilungsaktivität und eine verringerte Absterberate. Trotzdem können Nährstoffbedarf und Abtransport von Stoffwechselprodukten allein durch Diffusion nur bis zu einem Durchmesser von zwei Millimetern gedeckt werden. Weiteres Wachstum erfordert Neovaskularisation (Folkman 1986), die durch Tumorproduktion angiogenetischer Substanzen angeregt wird. Inzwischen konnten bei zahlreichen Tumoren angiogenetische Faktoren nachgewiesen werden (z.B. Basic Fibroblast Growth Factor, bFGF und Interleukin-8, IL-8), so daß diesem Forschungsfeld zunehmende Aufmerksamkeit gewidmet wird (Fidler 1997).

### **3.1.2 Motilität**

Motilität beschreibt die Fähigkeit der Zelle zu aktiver Bewegung (Klassifikation der zellulären Bewegungsmechanismen bei Keller et al 1977), die als „Taxis“ in gerichteter und als „Kinesis“ in ungerichteter Form stattfindet. Aktive Bewegung findet sich bei embryonalen Zellen, sowie beim Erwachsenen bei Monozyten, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Fibroblasten (Guyton 1986). Daneben existiert sie bei malignen Zellen (Übersicht bei Sträuli/Hämmerle 1984), die diese Eigenschaft im Rahmen der Metastasierung vielseitig einsetzen (Ablösung aus dem Primärtumorverband, Invasion, Extravasation). Die molekularen Mechanismen Chemotaxis, Chemokinesis und Haptotaxis sind identisch. Insbesondere die Chemotaxis stellt eine spezifische Bewegungsantwort dar, die eine Rolle in der von Paget 1889 formulierten „Saat-und-Boden-Theorie“ der Metastasierung spielt: spezielle Organmarker führen zu bevorzugter Absiedlung von Filiae („der richtige Boden“), beim Fehlen derselben findet kaum Absiedlung statt („der falsche Boden“, Müller-Hermelink/Müller 1994).

### **3.1.3 Invasion**

Ein wichtiger Schritt im Rahmen des Metastasierungsprozesses ist die Entwicklung invasiver Eigenschaften. Invasivität beginnt nach Liotta mit einer „defective interaction of invasive tumor cells with basement membranes“ und resultiert in der Degradation extrazellulärer Matrix. Er formulierte die „Three-step-theory of invasion“ mit den Schritten „attachment“, „dissolution“ und „locomotion“ (Liotta 1986).

#### **3.1.3.1 Attachment: Kontaktaufnahme zwischen Tumorzelle und Basalmembran**

Die Basalmembran stellt eine kontinuierliche Abgrenzung von Geweben (z.B. zwischen Stroma und Blutgefäßen) dar. Sie ist impermeabel für größere Proteine und wird nur im Rahmen der Gewebeheilung und bei entzündlichen Vorgängen für motile Zellen überwindbar (Poste/Fidler 1980). Ins Interstitium gelangende Tumorzellen stellen über „attachment“ Faktor Kontakt zum Hauptprotein der Basalmembran, dem Typ-IV-Kollagen, her. Meist handelt es sich um hochaffine Lamininrezeptoren (Terranova et al 1983, Rao et al 1983). Laminin ist ein in Basalmembranen häufig vorkommendes Glykoprotein, das an Typ-IV-Kollagen und

Glykosaminoglykane bindet. Barsky et al konnten 1984 zeigen, daß maligne Zellen, deren Lamininrezeptoren durch monoklonale Antikörper besetzt sind, metastatische Potenz verlieren. Auch typische Abbauprodukte proteolytischer Enzyme haben chemotaktische Wirkung: so konnten Boike et al zeigen, daß die spezifische Hemmung von Kathepsin B und L die Motilität deutlich reduzierte.

### **3.1.3.2 Dissolution: proteolytische Degradation der Basalmembran**

Nach dem attachment sezerniert die Tumorzelle proteolytische Enzyme, die Proteine der Basalmembran spalten. Hierbei konnte In-Vitro ein Zusammenhang zwischen der Aktivität proteolytischer Enzyme maligner Tumore und deren Metastasierungsfähigkeit gezeigt werden (Aznavorian et al 1992). Insbesondere Typ-IV-Kollagenase scheint „dissolution“ zu befördern und Metastasenbildung zu begünstigen (Liotta et al 1980). Unklar ist bisher aber noch, inwieweit die Synthese pathologischer Basalmembranproteine oder deren mangelhaftes extrazelluläres Zusammenfügen durch die Krebszellen selbst zur Entstehung von Poren beiträgt (Wagener 1999).

### **3.1.3.3 Locomotion: chemotaktisch aktivierte Migration durch die Basalmembran**

Durch die per dissolution entstandenen Lücken kann die Zelle die Basalmembran durchwandern und Anschluß an das Blutgefäßsystem gewinnen. Im Rahmen der Motilität finden spezifische Interaktionen zwischen Tumorzelle und Basalmembranmatrix statt (Lester/McCarthy 1992), die in gleicher Form bei der Extravasation aus dem Gefäßsystem eine Rolle spielen (Auerbach 1988).

## **3.2 Bronchialkarzinome, Proteasen und Metastasierung**

Für Bronchialkarzinome wurde die Expression proteolytischer Enzyme aller funktionellen Klassen nachgewiesen. NSCLC-Linien bilden die inaktive Proform der Zysteinproteinase Kathepsin L (Heidtmann et al 1993) und der Metalloproteinase Kathepsin D (Heidtmann 1994). Im Gegensatz zu SCLC-Zelllinien konnte für NSCLC des weiteren die Sekretion von Plasminogenaktivatoren und –inhibitoren nachgewiesen und deren Regulation unter verschiedenen Stimulationskonditionen weitergehend charakterisiert werden (Heidtmann et al 1989/1992). Die Konzentration von Plasminogenaktivatoren, zu deren Substraten neben Plasmin viele Bestandteile der Basalmembran gehören (Laminin, Fibronectin, Proteoglykane, nicht-fibrilläre Kollagene) steht bei vielen Krebsarten in Zusammenhang zu deren Aggressivität (Wagener 1999). Sehr wahrscheinlich spielt auch bei den Proteinasen eine Imbalance zwischen aktivierenden und inhibierenden Faktoren eine wichtige Rolle im pathologischen Prozess. Johnson et al. konnten 1986 zeigen, daß Kathepsin L als eine der aktivsten Proteinasen metastasierender Zellen z.B. den spezifischen  $\alpha_1$ -Proteinaseinhibitor proteolytisch zersetzt.

## 4 KATHEPSIN L

### 4.1 Einführung in die papainartigen Kathepsine

#### 4.1.1 Kathepsin L in der Systematik der Endopeptidasen

Innerhalb der verschiedenen Klassen der Proteinasen gehört Kathepsin L zur Superfamilie der Endopeptidasen, also Enzymen, die Peptidbindungen hydrolysieren. Nach einem Vorschlag von Barrett und Rawlings 1991 unterscheidet man vier Typen der Endopeptidasen mit mehreren Familien, Kriterien sind der katalytische Mechanismus und die evolutionäre Herkunft. Die Benennung erfolgt gemäß der Struktur im aktiven Zentrum (Aminosäure/ Metallion).

#### 6 Tabelle 4.1 Die wichtigsten Typen und Familien der Endopeptidasen

Katalytischer Typ	Familie, repräsentatives Mitglied	Beispiele für weitere Mitglieder
Serin	Chymotrypsin	Leukozytenelastase, Komplement- und Gerinnungsenzyme
	Subtilisin	Elastasen aus <i>Vibrio</i> -/ <i>Bacillus</i> species
Zystein	Papain	Lysosomale Kathepsine B, H, L, S
	Calpaine, Hemoglobinasen, Caspasen	
Aspartat	Pepsin	Renin, Kathepsin D und E
Metallo	Thermolysin	
Nicht-klassifiziert		

Schema vereinfacht nach Barrett/Rawlings 1991

Kathepsin L ist eine Zysteinendopeptidase aus der Papain-Familie, der der überwiegende Teil der Zysteinproteinasen angehört. Evolutionär fungierten papainartige Zysteinendopeptidasen zuerst in Verdauungsvakuolen von Protozoen. Die Abkömmlinge dieses archetypischen Enzyms sind mit intrazellulären Vakuolen (bei Pflanzen) und Lysosomen (bei Mensch und Tier) assoziiert (Barrett/Rawlings 1991), des weiteren spielen sie eine Rolle bei verschiedenen Tumoren.

#### 4.1.2 Grundcharakteristika der Kathepsine vom Papaintyp

Die Papainfamilie besteht neben den Kathepsinen aus derzeit etwa 80 weiteren, vor allem pflanzlichen Zysteinproteasen. Bis Ende der Achtziger Jahre waren die vier Kathepsine B, H, L und S mit den Methoden der Proteinanalyse beschrieben worden, neuere molekularbiologische Verfahren konnten in den letzten Jahren über Sequenzhomologien mehrere neue Mitglieder dieser Familie identifizieren (Bühling et al 1999): Kathepsin K (= O2), W, L2 (Santamaría et al 1998), Z, F und X.

7 **Tabelle 4.2 Grundcharakteristika der Kathepsine beim Menschen**

Kathepsin	MW(kD)	Chromosom	8	Stabil ität bei Neutralem pH	Kollagenolyse / Elastinolyse	Lokalisation
9 B	33	8	-	-	+	Ubiquitär
F	29	11	-	-	?	Herz, Hoden, Gehirn, Ovar
H	28	15	-	-	-	Ubiquitär
K	27	1	+/-	++++	+	Bronchialepithel
L	28	9	-	+++	+	Ubiquitär
L2	24	9	?	?	?	Bronchialepithel
S	28	1	+	++	+	Makrophagen
W	?	11	?	?	?	Lymphozyten
Z	?	20	?	?	?	Ubiquitär

Darstellung nach Bühling et al 1999, MW(kD): molecular weight in Kilodalton

#### 4.1.3 Aminosäuresequenz und katalytischer Mechanismus papainartiger Kathepsine

Bei allen Kathepsinen der Papain-Familie finden sich die Aminosäuren Cys<sup>25</sup> und His<sup>159</sup> (Nummerierung gemäß der Papainsequenz) im aktiven Zentrum. Die Thiol-Gruppe des Zystein und der Imidazolrest des Histidin formen ein Thiolat-Imidazol-Ionenpaar, das über einen breiten pH-Bereich starke nukleophile Eigenschaften bedingt und so die katalytischen Eigenschaften garantiert. Weitere wichtige Positionen sind Gln<sup>19</sup>, das das „Oxyanionenloch“ des katalytischen Zentrums maßgeblich mitformt und Asn<sup>175</sup>, das den Imidazol-Ring von His<sup>159</sup> ausrichtet. Die Aminosäuresequenzen um das aktive Zentrum finden sich ontogenetisch bei allen Kathepsinen konserviert (Rawlings/Barrett 1994).

**Tabelle 4.3 Sequenzhomologie um die katalytisch wichtigen Aminosäurepositionen Cys<sup>25</sup>, His<sup>159</sup>, Gln<sup>19</sup> und Asn<sup>175</sup> bei humanen Kathepsinen im Vergleich zum Papain**

10	Aminosäuresequenz gemäß der Papainnummerierung																																						
				2											15	16													17										
	6	7	8	9	0	A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	A	B	C	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	
Papain	N	F	I	C	C	-	S	C	C	S	C	N	I	S	-	-	-	I	I	N	I	I	C	N	C	I	I	N	I	I	I	I	I	I	I	I	S	N	C
HKatB	I	R	D	C	C	-	S	C	C	S	C	N	I	S	G	G	-	-	I	I	R	I	L	C	W	C	T	P	N	W	I	V	A	N	S	N	N		
HKatS	N	F	Y	C	C	-	S	C	C	A	C	N	I	S	-	-	-	I	G	N	L	V	N	C	N	C	K	E	N	W	I	V	F	I	S	N	C		

HKatL	N	F	I	C	C	-	Q	C	C	S	C	N	I	S	D	-	-	I	G	N	L	V	N	C	N	C	N	K	N	W	I	V	F	I	S	N	C
-------	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Darstellung nach Rawlings/Barrett 1994, HKatB: humanes Kathepsin B, HKatS: humanes Kathepsin S, HKatL: humanes Kathepsin L, Abkürzungen der Aminosäuren gemäß single letter code

Auf Aminosäureebene finden sich relativ hohe Homologiegrade, so weist z.B. die Sequenz von Kathepsin S eine Homologie von 49% zu Kathepsin L und von 23% zu Kathepsin B auf (Shi et al 1992), ähnliche Homologien lassen sich auch auf Nukleinsäureebene nachvollziehen. Die Tertiärstruktur des Papain findet sich bei den Kathepsinen: die Aminosäurekette ist in zwei Hauptdomänen gefaltet und formt so eine Lücke, in der das Substrat binden kann. Cys<sup>25</sup> und His<sup>159</sup> befinden sich in dieser Lücke an gegenüberliegenden Stellen der Domänen. Die Hydrolyse ist komplex und umfaßt die Schritte (1) nicht-kovalente Bindung zwischen Enzym und Substrat, (2) Bildung des Michaelis-Komplex, (3a) Acylierung des Enzyms mit Abgabe eines R'NH<sub>2</sub>-Restes, (3b) Deacylierung des Acyl-Enzyms unter Reaktion mit einem Wassermolekül und Abgabe des Katalyseprodukts. Danach steht das Enzym wieder zur Verfügung (Storer/Ménard 1994). Die Substratspezifitäten der Kathepsine sind hierbei ähnlich und umfassen die Hydrolyse von Peptid-, Amid-, Ester-, Thiolester- und Thionoesterbindungen (Bühling et al 1999).

#### 4.1.4 Funktion papainartiger Kathepsine

Kathepsine sind lysosomale Enzyme. Sie sind stark proteolytisch aktiv und bewältigen im Verbund mit anderen lysosomalen Enzymen den Proteinturnover im Körper des Menschen (bei einem Körpergewicht von 70 kg und einer täglichen Aufnahme von 70 g Protein werden 200-300 g Protein umgesetzt). Insbesondere die Subtypen L und K hydrolysieren z.B. im Vergleich mit den sehr aktiven pankreatischen Serinproteasen die meisten Peptidbindungen (Barrett/Kirschke 1981). Über den Proteinturnover sind papainartige Kathepsine praktisch an allen Um- und Abbauprozessen des Körpers beteiligt. Dies beinhaltet auch pathologische Prozesse wie z.B. emphyseminduzierende Umbauvorgänge der Raucherlunge (Takahashi et al 1993).

#### 4.1.5 Synthese und intrazellulärer Transport lysosomaler Kathepsine

Die Biosynthese lysosomaler Enzyme erfolgt im „overall pathway“ (Kornfeld 1987) an membrangebundenen Polysomen des rauen endoplasmatischen Retikulums (RER) – auf diesem Weg werden auch sekretorische und Plasmamembranproteine exprimiert. Über hydrophobe amino-terminale Signalpeptide, die von 11S-Ribonukleoproteinen an der RER-Membran erkannt werden, gelangt die Aminosäurekette ins Lumen des RER. Kotranslational werden Asparaginreste mit Oligosacchariden glykosyliert, anschließend wird das Signalpeptid abgespalten. In Vesikeln gelangen die Preproteine zum Golgi-Apparat, wo sie posttranslational

modifiziert werden. An die Oligosaccharide werden Phosphomannosylreste angelagert, so daß sie hochaffin an Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren (MPRs) des Golgi binden. Die Ligand-Rezeptor-Komplexe verlassen als „coated vesicles“ den Golgi und werden so von anderen Translationsprodukten getrennt (Man-6-P recognition pathway). In „prelysosomal staging areas“ werden Ligand und Rezeptor durch Ansäuerung getrennt, woraufhin der Rezeptor zum Golgi zurückgelangt und die Enzyme in Membranen zu Lysosomen zusammengefaßt werden. In einem zweiten, „secretion-recapture salvage pathway“ werden bis zu 20% der Enzyme prälysosomal sezerniert: sie binden an MPRs der Zellmembran, werden internalisiert und gelangen so in die Lysosomen (Kornfeld 1986).

## **4.2 Charakteristika von (Pro-)Kathepsin L**

### **4.2.1 Genetik und Proteinbiosynthese**

Kathepsin L ist auf Chromosom 9 kodiert (q21-22): das humane Gen besteht aus acht Exons und sieben Introns und umfaßt etwa 5100 bp (Chauhan et al 1992). Die Transskription des Gens führt zu zwei verschiedenen mRNA-Produkten (HKatL-A, HKatL-B), die sich in der Länge der 5'-nichtkodierenden Region unterscheiden. Die translatierten Anteile sind identisch. In Nierentumoren konnten zwei weitere Transkriptionsprodukte nachgewiesen werden, die sich durch das Fehlen von 27 bzw. 90 Nukleotiden im Exon I der HKatL-A-mRNA unterscheiden (sog. Splice-Varianten). Es wird vermutet, daß diese Verkürzung über eine veränderte Sekundärstruktur die Translationseffizienz beeinflusst (Rescheleit et al 1996).

Auch Kathepsin L unterliegt einer ausgedehnten posttranslationellen Modifikation: als Transkriptionsprodukt entsteht das 36-kD-Preprokathesin L, aus dem durch Abspaltung der 17-Aminosäuren-Prereion Prokathesin L entsteht. Durch Proteolyse der 96-Aminosäuren-Proregion (zwischen Signalsequenz und N-terminalem Ende) entsteht das 221 Aminosäuren umfassende Kathepsin L (etwa 28 kD), das erneut durch Proteolyse auf 21 kD aktiviert wird (Bühling et al 1999).

### **4.2.2 Substrate**

Kathepsin L ist eine der aktivsten Zysteinproteasen und setzt eine Vielzahl unterschiedlicher Moleküle katalytisch um. Zu den Substraten zählen z.B. Myosin, Aktin, Troponin, Calmodulin, Parvalbumin, Tubulin, Haemoglobin, Albumin, Histone, Insulin, Glukagon und viele andere. Von besonderer Bedeutung in pathologischen Prozessen – insbesondere im Rahmen der Metastasierung – dürfte die hydrolytische Spaltung von Proteinen der extrazellulären Matrix sein: hier spaltet Kathepsin L Typ-IV- und Typ-I-Kollagen, Vimentin, Fibronectin, Proteoglykane sowie Laminin und Elastase (Barrett/Kirschke 1981, Mason et al 1986).

### **4.3 Prokathepsin L und Kathepsin L bei malignen Tumoren**

#### **4.3.1 Überblick**

Kathepsin L wurde erstmals 1977 durch Kirschke et al beschrieben. Seine hohe katalytische Aktivität bei Basalmembranproteinen wurde daraufhin intensiv erforscht und charakterisiert (Mason et al 1984, Baricos et al 1988). Ähnlich wie bei Kathepsin D (Johnson et al 1993) und B (Rozhin et al 1987, Sloane et al 1990) rückte die Bedeutung der Protease bei malignen Erkrankungen in den Mittelpunkt des Interesses. Bei vielen Tumorzelllinien konnten Expression und z.T. eine enge Assoziation zwischen Prokathepsin L und dem metastatischen Potential nachgewiesen werden: dies gelang für H-ras-transformierte Maus-Fibroblasten (Denhardt et al 1987), Melanom- und Mammakarzinomzellen (Yagel et al 1989), Zelllinien aus kolorektalen Karzinomen (Sheahan et al 1989) und Pankreastumoren (Yamaguchi et al 1990), sowie für fos-transformierte Rattenzellen (Taniguchi et al 1990). Chauhan et al zeigten 1991 molekularbiologisch die vermehrte Expression erhöhter HKat-L-mRNA im Vergleich zu normalem Gewebe an über hundert verschiedenen Tumorgeweben. Hierbei fanden sich bei Nieren- und Hodentumoren die höchsten Mengen, gefolgt von NSCLC, erhöhte Mengen fanden sich bei Karzinomen aus Brust, Ovar, Kolon, Nebenniere, Blase, Prostata und Schilddrüse (Chauhan et al. 1991). Im Umkehrschluß konnte gezeigt werden, daß das Proliferations- und Metastasierungspotential maligner Zellen, deren Fähigkeit aktives Kathepsin L zu bilden gehemmt worden war, massiv abnahm (Yagel et al 1989, Weber et al 1994).

#### **4.3.2 Regulation der Prokathepsin-L-Expression maligner Zellen In-Vitro**

In Kultur gehaltene Tumorzellen können durch sehr unterschiedliche Substanzen zur Sekretion von Prokathepsin L stimuliert werden. Körpereigene Zytokine (Bühling et al 1999) wie der Epidermal Growth Factor (EGF), Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), der Platelet Derived Growth Factor (PDGF), aber auch Tumorpromotoren wie PMA (Heidtmann et al 1993) sind hier zu nennen. Die Induktion des Enzyms konnte durch  $\gamma$ -Interferon ( $\gamma$ -IF) auch an normalen Makrophagen gezeigt werden (Lah et al 1995). Als die Sekretion in-vitro hemmendes Zytokin ist Transforming Growth Factor  $\beta$  (TGF $\beta$ ) bekannt (Bühling et al 1999) und als weitere nicht-synthetische Substanzen Human Plasma  $\alpha$ -Cysteine Proteinase Inhibitor ( $\alpha$ CPI, Gounaris et al 1984) und Squamous Cell Carcinoma Antigen (SCCA, Takeda et al 1995). Insgesamt ist der Einfluß allein der körpereigenen Substanzen auf die Prokathepsin-L-Expression sehr komplex und kann bisher nicht als verstanden gelten.

#### **4.3.3 Prokathepsin L-Aktivierungsmechanismen**

Eine Vielzahl maligner Tumore exprimieren und sezernieren inaktives Prokathepsin L, was deren Metastasierungsfähigkeit erhöht. Diese Assoziation von Befunden bedingt für den



anzunehmenden Fall eines Kausalzusammenhangs die extrazelluläre Aktivierung des Proenzym. Dies ist umso plausibler, da man weiß, daß aktives Kathepsin L zwar hochaktiv aber gleichzeitig unter physiologischem pH nur sehr kurzlebig ist (Wiederanders/Kirschke 1989). Daher rückt die Frage nach möglichen extrazellulären Aktivierungsmechanismen in den Vordergrund - hierzu existieren folgende Modellvorstellungen:

- (1) Prokathepsin L wird extrazellulär über pH-abhängige Konfigurationsänderungen aktiviert,
- (2) Prokathepsin L unterliegt extrazellulär einer Autoaktivierung durch Kathepsin L,
- (3) Prokathepsin L wird extrazellulär durch limitierte Proteolyse durch andere Enzyme aktiviert.

#### **4.3.3.1 pH-abhängige Aktivierung von Prokathepsin L**

Die Spontanaktivierung von Prokathepsin L bei pH 3,0 ist nachgewiesen (Gal/Gottesmann 1986, Maciewicz et al 1988 und 1990). Die entstehende Aktivität ist so ausgeprägt, daß die „saure Aktivierung“ als Standardvergleichsmethode für andere Aktivierungsmechanismen gilt. Die theoretische Übertragbarkeit auf In-vivo-Verhältnisse wird aber durch ebendies eingeschränkt, denn unter den physiologischen Bedingungen des Interstitiums tritt ein pH von 3,0 nicht auf. Zwar weiß man, daß Osteoklasten in der Lage sind in Bone-remodelling-units (BRUs) Mikrolakunen am Osteoid zu bilden, in denen durch Akkumulation schwacher Säuren der pH stark gesenkt werden kann und so lysosomale Enzyme aktiviert werden (Baron et al 1985), allerdings fehlt bisher der Nachweis solcher Fähigkeiten für neoplastische Zellen. Daher vermuteten schon Maciewicz et al 1988 die Notwendigkeit von „components or structures that induce conformational changes at less acidic pH values in vivo“.

#### **4.3.3.2 Autoaktivierung von Prokathepsin L durch aktives Kathepsin L**

Ménard et al konnten 1998 nachweisen, daß (im Gegensatz zu den Prokathepsinen B, K und S) unter In-vitro-Bedingungen bei schwach saurem pH von 5,3 Prokathepsin L durch geringe Mengen Kathepsin L aktiviert wird. Die Proteolyse erfolgt nahe dem N-terminalen Ende des aktiven Enzyms an einer Stelle der Proregion, deren Sequenz einen Teil der Substratspezifität des Enzyms bedingt. Im Gegensatz zur „sauren Aktivierung“ scheint hier der pH-Wert nicht das primäre Problem bei der Übertragbarkeit zu sein. Das Problem besteht darin, daß auch dieser Mechanismus aktiviertes Enzym benötigt, das über einen anderen Mechanismus generiert werden muß. Könnte dieser hypothetische Mechanismus geklärt werden, so wäre die Autokatalyse ein qualitativ wie quantitativ bedenkenswertes Modell.

#### **4.3.3.3 proteolytische Aktivierung von Prokathepsin L durch andere Proteasen**

Basierend auf Arbeiten von Nishimura et al aus den Jahren 1987-1989 konnten Wiederanders/Kirschke 1989 zeigen, daß Prokathepsin L durch limitierte, Kathepsin-D-abhängige Proteolyse zu einer enzymatisch aktiven 32,5-kD-Form aktiviert werden konnte.

Dieser Nachweis gelang bei einem pH um 5,5 (das rekombinante Prokathepsin L stammte aus Ratten-Fibroblasten). Hara et al hatten ein Jahr zuvor in vivo an Ratten-Makrophagen die sequentielle Aktivierung von Prokathepsin L per Proteolyse durch (1) eine Metalloproteinase und (2) eine Zysteinproteinase zeigen können. Die Übertragbarkeit dieses Modells auf die Verhältnisse im lebenden Organismus scheint am ehesten gegeben. Allerdings fehlt bisher der Nachweis einer extrazellulären, proteolysevermittelten Aktivierung von Prokathepsin L bei Tumorzellen in vitro. Insbesondere eine Aktivierbarkeit bei physiologischem pH könnte hier (theoretisch formulierte) Bedingungen der Realität erfüllen. Proteasen, die als Kandidaten für eine limitierte extrazelluläre Proteolyse von Prokathepsin L in Frage kämen, sollten also bei physiologischem pH aktiv sein.

## **5 AUFGABENSTELLUNG**

In der Einleitung wurde dargestellt, daß der prognoseentscheidende Schritt im klinischen Verlauf einer NSCLC-Erkrankung die Metastasierung ist. Der Übergang vom lokalen Geschehen zur disseminierten Erkrankung ist mit einer krassen Verschlechterung der Überlebenswahrscheinlichkeit und einer starken Einschränkung der Therapieoptionen verbunden. Kathepsin L spielt hier eine bedeutende Rolle nicht nur bei der Metastasierungsfähigkeit maligner Bronchialtumoren, sondern auch bei sehr vielen anderen Krebsformen. Die Art der extrazellulären Aktivierung des von NSCLC als inaktives Proenzym sezernierten Prokathepsin L ist hierbei nicht geklärt. Über das aus der in Marburg etablierten NSCLC-Zelllinie EPLC 32 M1 gewonnene Prokathepsin L ist es möglich, In-vitro-Aktivierungen des Proenzym zu untersuchen. Hierbei interessiert das proteolytische Aktivierungsmodell, in dem andere Enzyme Prokathepsin L zum aktiven Kathepsin L umsetzen. Der erste Teil meiner Aufgabe besteht in der Erstellung einer hochgereinigten Prokathepsin-L-Probe aus der Linie EPLC 32 M1. Im zweiten Teil ist die mögliche Aktivierung zu Kathepsin L durch die Proteasen HLE und PSA unter In-vitro-Bedingungen zu testen.

## MATERIAL UND METHODEN

### 6 Übersicht über die verwendeten Reagenzien

Die verwendeten Reagenzien wurden in der handelsüblichen Reinheit von den angegebenen Herstellern bezogen. In den nachfolgenden Abschnitten werden die Reagenzien entsprechend den in der linken Spalte eingeführten Kürzeln benannt.

**Tabelle 6.1 verwendete Reagenzien**

APS, Elektrophoresekatalysator	Bachem, Heidelberg
Aq.dest., Aqua destillata Braun	B.Braun, Melsungen
Acrylamid	Bachem, Heidelberg
Avidinkomplex (Avidin/Peroxidase)	Sigma, Deisenhofen
BRIJ 35 30% w/v	Sigma, Deisenhofen
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA, Bovines Serumalbumin	Sigma, Deisenhofen
Butanol	Serva, Heidelberg
CBA, Cibachron Blue Agarose	Serva, Heidelberg
CH <sub>3</sub> OH, Methanol	Sigma, Deisenhofen
DMSO, Dimethylsulfoxid	Sigma, Deisenhofen
DTT, Dithiotreitol	Serva, Heidelberg
EDTA, Ethylendiamintetraacetat	Sigma, Deisenhofen
Farbindikator Phenolrot	Serva, Heidelberg
FKS, Fetales Kälberserum	Life Technologies, Paisley, UK
Glycerin	Serva, Heidelberg
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%, Wasserstoffperoxid	Serva, Heidelberg
HCl, Salzsäure, 1 M	Merck, Darmstadt
HEPES	Life Technologies, Paisley, UK
hmwm, High molecular weight protein marker	Bachem, Heidelberg
Jodacetamid	Serva, Heidelberg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Sigma, Deisenhofen
lmwm, Low molecular weight protein marker	Bachem, Heidelberg
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O, Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt

NaAc, Natriumacetat	Merck, Darmstadt
NaCl, Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
NADH, Nikotinamidadenindinukleotid	Merck, Darmstadt
N <sup>7</sup> N <sup>4</sup> -bis-methylen-acrylamid	Bachem, Heidelberg
PBS, Phosphat-gepufferte NaCl-Lösung	Boehringer, Mannheim
PBC, OSGS 44/45 Phosphate Buffer Concentrate	Behring, Marburg
Penstrep, Penicillin-Streptomycin-Lösung	Life Technologies, Paisley, UK
Pepstatin A	Sigma, Deisenhofen
Phenol 85%	Serva, Heidelberg
PMA, Phorbol-12-Myristat-13-Acetat	Sigma, Deisenhofen
PMSF, Phenylmethylsulfonylfluorid	Sigma, Deisenhofen
Rmwm, Rainbow molecular weight protein marker	Amersham, Little Chalfont, UK
Rb-anti-nIgG (Rabbit-anti-normal-IgG)	Life Technologies, Paisley, UK
Rb-anti-ProL (Rabbit-anti-Prokathepsin-L)	Eigenes Labor
RPMI 1640	Life Technologies, Paisley, UK
Sephadex G-150	Pharmacia Biotech, Uppsala, Sverige
SDS, Sodiumdodecylsulfat	Serva, Heidelberg
Sw-anti-Rb (Swine-anti-Rabbit)	Life Technologies, Paisley, UK
TEA, Triethanolamin	Serva, Heidelberg
TEMED, Elektrophoresekatalysator	Bachem, Heidelberg
Thiocyanat	Sigma, Deisenhofen
Tris-HCl	Merck, Darmstadt
Triton	Sigma, Deisenhofen
Tween	Serva, Heidelberg
Vitrogen	Paisel & Lauri, Hamburg
Zitrat, Zitronensäure-Monohydrat	Merck, Darmstadt
Z-Phe-Arg-AMC, Z-Phe-Arg-AMC-Standard	Bachem, Heidelberg

## 7 Zubereitung der Medien, Lösungen und Puffer

### 7.1 Zellkultur, Expansion und Wannenstapel

Alle für Zellkulturzwecke verwendeten Lösungen und Medien wurden vor Anwendung im Wasserbad (GfL 1083, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel) auf 37°C erwärmt und unter der Sterilbank zubereitet (Clean-Bench und Kulturschrank, Fa. Greiner, Kremsmünster Schweiz). Die Zubereitung erfolgte gemäß den Marburger Vorarbeiten von Bepler et al 1988.

**Tabelle 7.1 Medien, Lösungen und Puffer für die Zellkultur**

Bezeichnung	Bestandteile	Anmerkung	Haltbarkeit
Kulturmedium „R10“	FKS 500 ml RPMI 1640 (10 x 500 ml)	FKS zur Komplementinaktivierung 1h bei 56°C erwärmen; pro Flasche RPMI 50 ml durch 50 ml FKS ersetzen	2 Wochen, +4-+6°C
Kulturmedium „R0“	RPMI 1640 (3 x 500 ml) HEPES 15 ml 1M BSA 750 mg Penstrep 15 ml L-Glutamin 15 ml	pro Flasche 250 mg BSA in 20 ml RPMI lösen und sterilfiltrieren (0,22 µm, Millipore Millex GS, Molsheim, France), ebenso je 5 ml HEPES, L-Glutamin und Penstrep	2 Wochen, +4-+6°C
EDTA 0,02%/PBS	EDTA 100 mg, PBS 500 ml		1 Jahr, -20°C
PMA/DMSO	PMA 6,16 mg DMSO 10 ml	Kanzero- und teratogen	1 Jahr, -20°C
PMA/R0	PMA 15 µl PMA, R0 500 ml		Ø
Einfrierpuffer	Citrat 1 ml 0,5 M, NaCl 375 µl 4 M, EDTA 100 µl 0,1 M, PMSF 100 µl 0,1 M, Pepstatin 2 µl 10 mM, Aq. dest. 8423 µl		Ø
PBS-Zellen	OSGS 44/4550 ml, Aq.dest. 950 ml		2 Wochen, +4-+6°C

**7.2 fluorometrische Kathepsin L-Assays: Puffer und Assaylösungen**

Die pH-Einstellung der Puffer wurde mit 1 M HCl bei 37°C im Wasserbad per pH-Meter (Microprozessor pH537, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel) durchgeführt. Die Zubereitung erfolgte gemäß der Erstbeschreibung der Assays von Barrett und Kirschke 1981 (alle verwendeten Laborgefäße Fa.Schott, Mainz).

**Tabelle 7.2 Puffer und Assaylösungen für die fluorometrischen Kathepsin-L-Assays**

Bezeichnung	Bestandteile	Haltbarkeit
Ausgangslösungen und -puffer		
0,5 M Citrat pH 3,0	Citrat 10,5 g, Aq.dest. 100 ml	2 Wochen, +4-+6°C
BRIJ 35 0,5 %	BRIJ 35 30 % w/v 1 ml, Aq.dest. 60 ml	2 Wochen, +4-+6°C
0,1 M EDTA pH 7,4	EDTA 3,8 g, Aq.dest. 100 ml	2 Wochen, +4-+6°C
0,1 M DTT	DTT 760 mg, Aq.dest. 50 ml	1 Jahr, -20°C
0,5 M NaAc pH 5,5	NaAc 4,2 g, Aq.dest. 100 ml	2 Wochen, +4-+6°C
0,1 M NaAc pH 4,3	NaAc 8,02 g, Aq.dest. 1000 ml	2 Wochen, +4-+6°C
Substratlösungen/Stopplösung		

Z-Phe-Arg-AMC-Substratlösung	Z-Phe-Arg-AMC 100 µl 10 mM, BRIJ 35 0,5 % 9 ml, Aq.dest. 1 ml	1 Jahr, -20°C
Z-Phe-Arg-AMC-Eichlösung	Z-Phe-Arg-AMC-Std. 50 µl 10 mM, 0,5 M NaAc pH 5,5 12,5 ml, BRIJ 35 0,5 % 10 ml, 0,1 M NaAc pH 4,3 50 ml, Aq.dest. 27,5 ml	2 Wochen, +4-+6°C
10 <sup>-5</sup> M Jodacetamid	Jodacetamid 92 mg, 0,1 M NaAc pH 4,3 100 ml	Ø
Aktivierungspuffer (= APu)		
APu pH 3,0	0,5 M Citrat pH 3,0 800 µl, 0,1 M DTT 80 µl, 0,1 M EDTA pH 7,4 40 µl, BRIJ 35 0,5% 100 µl	2 Wochen, +4-+6°C

### 7.3 Puffer und Lösungen für die Aufreinigung des konditionierten Mediums

Nach Erstellung und pH-Einstellung wurden alle Puffer für Chromatographiesäulen gefiltert (Faltenfilter 5951/2, Schleicher&Schuell, Dassel) und unter Rühren (Magnetrührer, Fa. Knick, Berlin) am Wassersog entgast (Filtriervorstoß, Filtertiegel 2D, Saugflasche, Fa. Schott, Mainz).

**Tabelle 7.3 Puffer und Lösungen für die Aufreinigung des konditionierten Mediums**

Bezeichnung	Bestandteile	Haltbarkeit
Äquilibrationspuffer für die CBA-Chromatographie		
PBS 10fach	NaCl 135,5 g, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 35,6 g, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 8,16 g, Aq.dest. 2 l	1 Jahr, +4-+6°C
Regenerationspuffer für die CBA-Chromatographie		
1,5 M Thiocyanat	Menge für 8 l 1,5 M LösungXXX, Aq.dest 8 l	2 Wochen, +4-+6°C
Äquilibrationspuffer für Sephadex G-150- und DE 52-Chromatographie		
0,02 M TEA/0,15 M NaCl pH 7,4	TEA 5,96 g, NaCl 17,5 g, Aq. dest. 2 l	2 Wochen, +4-+6°C
Dialysepuffer für die Entsalzung in Spectrapor-Dialyseschläuchen		
0,02 M TEA pH 7,4	TEA 11,92 g, Aq.dest. 4 l	2 Wochen, +4-+6°C

### 7.4 Puffer und Lösungen für die Gelelektrophorese und den Western Immunoblot

Bei der Erstellung der Acrylamid-Stocklösung mußten die hohe Neurotoxizität der Substanz beachtet und entsprechende Vorsichtsmaßnahmen ergriffen werden. Soweit pH-Werte angegeben sind wurde entsprechend adjustiert.

**Tabelle 7.4 Puffer und Lösungen für Gelelektrophorese und Western Immunoblot**

Bezeichnung	Bestandteile	Haltbarkeit
Grundlösungen und Puffer für die Gelelektrophorese		
30%ig-Acrylamid (T/C=30%/2,67%)	Acrylamid (=T) 146 g, N'-N'-bismethylen- acrylamid (=C) 4 g, Aq.dest. 500 ml	6 Monate, +4-+6°C, dunkel lagern

Trenngelpuffer pH 8,8	Tris 91 g, SDS 10 ml 20%, Aq.dest 500 ml	2 Wochen, +4-+6 °C
Sammelgelpuffer pH 6,8	Tris 30,2 g, SDS 10 ml 20%, Aq.dest. 500 ml	2 Wochen, +4-+6°C
Probenpuffer pH 6,8	Tris 0,75 g, Glycerin 10 g, Bromphenolblau 5 ml 0,1%, Aq.dest. 100 ml	2 Wochen, +4-+6°C
Elektrophoresepuffer	Glycin 14,4 g, Tris 3 g, SDS 5 ml 20%, Aq.dest 1000 ml	Ø
Katalysatoren	APS 50 µl, TEMED 5 µl (pro Gel in Trenngelpuffer); APS 50 µl, TEMED 10 µl (pro Gel in Sammelgelpuffer)	Ø
Grundlösungen für den Western Immunoblot		
Blotpuffer	Tris 6 g, Glycin 28,8 g, Methanol 400 ml, Aq.dest 1600 ml	2 Wochen, +4-+6°C
Waschpuffer	Tween 20 1 ml, PBS 2l	2 Wochen, +4-+6°C
10fach PBS	NaCl 67,75 g, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O 17,79 g, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 4,08 g, Aq.dest 1000 ml	6 Monate, +4-+6°C
NBT/Triton	NBT 150 mg, PBS 250 ml, Triton 250 µl	1 Jahr, -20°C
Lösungen und Antikörper für Durchführung und Entwicklung des Immunoblot		
Blocklösung	BSA 3 g, PBS 100 ml	3 Monate haltbar (+Acid), +4-+6°C
Erstantikörper (Rb-anti-ProL)	1:4000, für 4 x 20 ml BSA 3% 26,6 ml, Waschpuffer 53,4 ml, Rb-anti-ProL 20 µl	Ø
Kontroll-Erstantikörper (Rb-anti-nIgG)	1:2500, für 4 x 20 ml BSA 3% 26,6 ml, Waschpuffer 53,4 ml, Rb-anti-nIgG 32 µl	Ø
Zweitantikörper (Sw-anti-rb)	1:1000, für 8 Gele BSA 3% 53,2 ml, Waschpuffer 106,8 ml, Sw-anti-rb 160 µl	Ø
Avidinkomplex	Avidin 45 µl, Peroxidase 45 µl, PBS 5 ml, 1:50 in PBS, pro Gel 20 ml	Ø
Substrat-/Entwicklerlösung	NADH 100 mg, PBS 50 ml, NBT/Triton 10 ml, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 50 µl 30%, Phenol 50 µl 85%	Ø

## 8 ZELLKULTUR

Wie die Kulturmedien wurden die folgenden Arbeitsabläufe mit auf 37°C erwärmten Reagenzien unter der Sterilbank (Clean-Bench, Fa. Greiner, Kremsmünster Schweiz) durchgeführt.

### 8.1 Haltung der Stammkultur, Passagieren und Expansion

Nach Entnahme aus der Zellbank wurden die Zellen in einer mittelgroßen Kulturflasche (250 ml, Fa. Greiner, Frickenhausen) mit 20 ml R10 im Brutschrank (Kulturschrank, Fa. Greiner, Kremsmünster Schweiz, 37°C, 5% pCO<sub>2</sub>) kultiviert. Bei einer Populationsverdopplungszeit von 16h erfolgten zwei Passagen pro Woche, der Passagezeitpunkt wurde durch den Farbumschlag des Farbindikators Phenolrot angezeigt. Nach dem Dekantieren des Mediums wurde der Zellrasen mit 4 ml EDTA 0,02%/PBS bedeckt und nach wenigen Minuten durch Klopfen an der Kulturflasche abgelöst. 0,5 ml der EDTA-Zellsuspension wurden in eine Kulturflasche mit 20 ml R10 ausgesät. Zur Gewinnung von konditioniertem Medium im Wannenstapel, wurden 16 große Zellkulturflaschen (650 ml, Greiner, Frickenhausen) per Expansion kultiviert (1 ml EDTA-Zellsuspension als Aussaat, 8 ml EDTA 0,02% in PBS zum Ablösen, 40 ml R10).

### 8.2 Gewinnung großer Mengen konditionierten Mediums per Wannenstapeltechnik

Die aus 16 großen Zellkulturflaschen gewonnene EDTA-Zellsuspension wurde 1:1 mit PBS-Zellen für 2 x 10 Minuten bei 800 U/min (Zentrifuge ZK 364, B.Hermile GmbH&Co., Gosheim, Zentrifugenröhrchen 50 ml, Nunc, Wiesbaden) zentrifugiert. Das Pellet wurde in R0 resuspendiert und zur R0-Flasche gegeben. Der Wannenstapel (Nunc, 1800 ml, Nunc, Wiesbaden) wurde nun mit dem Kollagengemisch Vitrogen (das den Zellen adhärentes Wachstum ermöglicht) beschichtet und in folgender Reihenfolge bestückt: (1) R0 ohne Zellen und ohne PMA, (2) R0-Zellsuspension, (3) R0-PMA. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 5% pCO<sub>2</sub>. Nach 48h wurde das konditionierte Medium geerntet und die Zellen mit 300 ml EDTA 0,02% /PBS abgelöst. Das Medium wurde zur Entfernung von Zellresten in einer Kühl-Zentrifuge (Zentrifuge J2-21, Rotor JA-14, Zentrifugegefäße 250 ml, Beckmann, Palo Alto, USA) für 25 Minuten bei 5000 U/min und 4°C zentrifugiert und der Überstand bei -80°C eingefroren (Einfriergefäße 500 ml, Nunc, Wiesbaden). Die EDTA-Zellsuspension wurde wie beschrieben mit PBS zentrifugiert, das Pellet in 10 ml Einfrierpuffer resuspendiert und bei -20°C eingefroren.

## 9 GEWINNUNG VON PKatL AUS KONDITIONIERTEM MEDIUM

Das konditionierte Medium wurde unter Einsatz verschiedener Techniken der Einengung und Konzentration im Hinblick auf eine möglichst reine Prokathepsin L-Probe aufgearbeitet.

**Tabelle 9.1 Vorgehensweise bei der Aufarbeitung des konditionierten Mediums**

Reinigungsziel	Methode	Verwendetes System
Entfernen des BSA	Affinitätschromatographie	Cibacron Blue Agarose
Volumeneinengung	Membranfiltration	Centriprep



M <sub>w</sub> -bezogene Einengung	Gelfiltration	Sephadex 150
Entsalzung	Membrandialyse	Spectrapor
Ladungs-bezogene Einengung	Gelfiltration	DE-52
Volumeneinengung	Membranfiltration	Centriprep

M<sub>w</sub>: molecular weight

## 9.1 Evaluation des Reinigungserfolges

Vor jedem Reinigungsschritt wurde der Zustand der Probe durch folgende Verfahren evaluiert:

- (1) Bestimmung der Proteinkonzentration
- (2) Bestimmung der Kathepsin L-Aktivität durch spezifischen Assay.

Nach Abschluß der Reinigungsschritte erfolgte neben den o.a. Zwischenevaluationen eine qualitative Untersuchung der Endprobe auf Prokathepsin L im Western Immunoblot.

### 9.1.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde vor jedem Reinigungsschritt durch eine photometrische Extinktionsmessung bestimmt (Photometer Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech, Uppsala, Sverige,  $\lambda$ : 280 nm gegen Aq.dest.). Bei dieser Wellenlänge entspricht die gemessene Extinktion näherungsweise der Proteinkonzentration der Lösung in mg/ml. Durch Multiplikation des Meßergebnisses mit dem Gesamtvolumen der Probe ließ sich der Gesamtproteingehalt ermitteln.

### 9.1.2 Fluorometrische Assays zur Kathepsin L-Aktivitätsmessung

Zur Quantifizierung der Enzymaktivität wurden zwei Varianten des fluorometrischen Kathepsin L-Assays (KatL-Assay) eingesetzt:

- (1) KatL-Assay bei pH 3,0 (KatL-Assay pH 3,0)
- (2) KatL-Assay bei pH 5,5 nach Aktivierung bei pH 3,0 (KatL-Assay pH 3,0/5,5)

#### 9.1.2.1 KatL-Assay pH 3,0

Diese gegen Störeinflüsse durch unspezifischen Enzyminhibitoren unempfindlichere Assayvariante wurde bei niedrigen bis mittleren Reinigungsstufen verwendet. Jede Probe wurde zur Kontrolle von Pipettierfehlern als Doppelansatz gemessen, der Assayansatz setzte sich pro Cup (Reaktionsgefäß 3812, 2,2 ml mit Deckel, Eppendorf, Hamburg) wie folgt zusammen: 250 µl 0,5 M Citrat pH 3,0, 100 µl BRIJ 35 0,5 %, 20 µl 0,1 M DTT, 10 µl 0,1 M EDTA pH 7,4, 350 µl Aqua destillata, 20 µl Probe. Als Positivkontrollen wurde immer ein Doppelansatz mit hochgereinigtem Prokathepsin L (in unserem Labor aus Vorversuchen vorhanden) mitangesetzt. Nach Vorinkubation im Wasserbad (GfL 1083, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel) bei

37°C für 5 Minuten wurden 250 µl Z-Phe-Arg-AMC als Substrat zugegeben. Die Umsetzung des Substrates durch das Enzym wurde nach 30 Minuten mit 1 ml 10<sup>-5</sup> M Jodacetamid beendet und der Inhalt jedes Cups in Fluoreszenz-Küvetten (101-QS, 0,00 mm, K 282/2x, Hellma, München) im Fluoreszenz-Spektrometer (SFM 25, Kontron, Milan, Italia, Exzitation 370 nm, Emission 460 nm, Response Time 1.0 s, Kalibrierung 100,0) gemessen.

Der Mittelwert jeder Doppelbestimmung wurde zur Berechnung der Aktivität verwendet:

$$\delta RF_p \times c_{(Std)} \times Vol_{(Küv)} / \delta RF_{Std} \times Vol_p \times t = \text{Aktivität der Meßprobe (nmol/min)}$$

$\delta F_p$  = Differenz der Relativen Fluoreszenz der Meßprobe = Meßwert am Spektrometer

$c_{(Std)}$  = Konzentration des Standards = 5 nmol

$Vol_{(Küv)}$  = Volumen der Küvette = 2 ml

$\delta RF_{Std}$  = Differenz der Relativen Fluoreszenz des Standards = 100

$Vol_p$  = Volumen der Meßprobe = (hier:) 0,02 ml

$t$  = Meßintervall = 30 Min

$$\Rightarrow \delta RF_p \times 5 \text{ nmol} \times 2 \text{ ml} / 100 \times 0,02 \text{ ml} \times 30 \text{ min}$$

$$\Rightarrow \delta RF_p \times 10 \text{ nmol} / 60 \text{ min}$$

$$\Rightarrow \delta RF_p \times 0,16 \text{ nmol/min}$$

Zum Abschluß der Auswertung multiplizierte man die erhaltene Aktivität der Meßprobe mit dem Gesamtvolumen der Probe (in ml) und erhielt die Gesamtaktivität der Probe

#### 9.1.2.2 KatL-Assay pH 3,0/5,5

Diese Variante des Assays wurde zur Aktivitätsbestimmung der höheren Reinigungsstufen ab der ersten Gelfiltration genutzt. Nach Entfernung eines Großteils der unspezifischen Enzyminhibitoren reagiert diese Variante sensibler und meßgenauer. Bei gleichem Vorgehen wurde pro Cup wie folgt pipettiert: 250 µl 0,5 M NaAc pH 5,5, 100 µl BRIJ 35 0,5 %, 20 µl 0,1 M DTT, 10 µl 0,1 M EDTA pH 7,4, 330 µl Aq.dest. Die Probe wurde 1:3 mit APu bei 37°C für 10 Minuten vorinkubiert. Aufgrund der höheren Sensitivität im Vergleich mit dem KatL-Assay pH 3,0, genügte Probenvolumen von 5-10 µl. Aktivierungsansatz (Probe und Aktivierungspuffer) und Assayansatz inkubierten 5 Minuten gemeinsam, bevor das Substrat zugegeben wurde. Die folgenden Schritte erfolgten analog dem o.a. Vorgehen.

#### 9.1.3 Qualitativer Nachweis von Prokathepsin L im Western Blot

Nach abgeschlossener Aufreinigung des konditionierten Mediums erfolgte abschließend ein spezifischer Nachweis von Prokathepsin L:

- (1) Gelelektrophorese per SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese)
- (2) Western Immunoblot des Elektrophoresegeles

### 9.1.3.1 Gelelektrophorese per SDS-PAGE

Die Trenngele wurden jeweils am Vortag gegossen, wobei pro Durchgang 2 Gele (1 Kontrollgel, 1 spezifisches Gel) benötigt wurden. Je 5 ml Gelgrundlösung wurden für 1 Trenngel (Elektrophoresekammern mit gesamtem Zubehör von Pharmacia, Uppsala, Sverige) pipettiert (pro Gelkammer 5 ml). Zum Schutz vor Austrocknung wurde das Trenngel mit Butanol überschichtet. Zum Polymerisieren wurden die Gele bei +4°C gelagert. Das u.a. Schema genügte pro Ansatz für 2 Trenngele bzw. 4 Sammelgele (je nach verwendetem Puffer), für die Western Blots wurden 8%ige SDS-Gele verwendet.

**Tabelle 9.2 Pipettierschema für SDS-Elektrophoresegele**

%T	30%-Acrylamid (ml)	Gelpuffer (ml)	Aq.dest. (ml)
4	1,33	2,5	6,15
5	1,67	2,5	5,8
6	2,0	2,5	5,55
7	2,33	2,5	5,15
8	2,67	2,5	4,8
9	3,0	2,5	4,45
10	3,33	2,5	4,15

Am Folgetag wurden nach Entfernung des Butanols die Sammelgele gegossen und mit 10er Kämme bestückt. Die Proben wurden 1:1 mit Probenpuffer verdünnt und in Cups (Reaktionsgefäß 3812, 2,2 ml mit Deckel, Eppendorf, Hamburg) für 2 Minuten bei 100°C im Wasserbad (GfL 1083, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel) gekocht und dann in die Sammelgeltaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde für 60 Minuten bei 170-190 V in Elektrophoresepuffer durchgeführt.

### 9.1.3.2 Western Immunoblot des Elektrophoresegels

Die Gele wurden direkt nach der SDS-PAGE in Blotkammern (mit gesamtem Zubehör von Pharmacia, Uppsala, Sverige) für 60 Minuten bei 100 V in (mit Laboreis gekühltem) Blotpuffer auf die Membran geblottet. Zur Hemmung unspezifischer Proteinanlagerungen wurde die Membran für 60 Minuten bei Raumtemperatur mit 20 ml Blocklösung inkubiert und anschließend für 3x10 Minuten mit jeweils 40 ml Waschpuffer auf dem Probenrüttler (GfL 284, Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel) gewaschen und anschließend mit den Erstantikörpern über Nacht inkubiert.

**Tabelle 9.3 Antikörperschema für den Western Immunoblot**

Antikörper	Spezifisches Gel	Kontrollgel
Erstantikörper	Rb-anti-ProL	Rb-anti-nIgG
Zweitantikörper	Sw-anti-Rb	

Am folgenden Tag wurden die Blots erneut gewaschen und für 60 Minuten bei Raumtemperatur mit dem Zweitantikörper inkubiert, nochmals gewaschen und nach 30 Minuten Inkubation im Avidinkomplex abschließend gewaschen. Nach 5 Minuten Inkubation mit der Substratlösung wurde die Entwicklung je nach Bandenausprägung mit Aq.dest. gestoppt und die Blots getrocknet.

## **9.2 Affinitätschromatographie**

Cibacron Blue Agarose (CBA) sollte BSA aus dem konditionierten Medium entfernen. CBA wurde hierzu bei geöffnetem Auslaß 1:1 mit PBS-S auf die Chromatographie-Säule (Econocolumn, 20cm x 2,5cm, BioRad, München) gegeben, so daß ein leichter Sog entstand und sich die Gelsäule gut gepackt absetzte. Die Säule wurde langsam tropfend in 4 l PBS-S 1fach äquilibriert und die Probe anschließend auf die Säule aufgetragen. Der Durchfluß (Tropfgeschwindigkeit 1 ml/min) wurde zu je 10 ml aliquotiert (Fraktionensammler LKB RediFrac, Pharmacia, Uppsala, Sverige) und der Reinigungserfolg wie o.a. untersucht. Zur Degeneration der gebundenen Proteine wurde CBA auf einer Waschvorrichtung (Filternutsche 25 D, Saugflasche, Fa.Schott, Mainz) mit 8 l 1,5 M Thiocyanat und 16 l Aq.dest. gewaschen und 1:1 in PBS-S bei +4-+6 °C aufbewahrt (nach dem Waschen erneut verwendbar).

## **9.3 Membranfiltration**

Die Konzentrierung der Probe per Membranfiltration erfolgte mit dem Centriprep-System (Centriprep 10, Amicon, Beverly, USA, Porendurchlässigkeit bis 10 kD). Die Probe wurde bei 2500 U/min bei +4°C für 15 Minuten zentrifugiert (Cryofuge 5000, Heraeus, Hanau). Nach jedem Durchgang wurde das Filtrat dekantiert und das Retentat mit den Proteinen (>10 kD) geerntet. Durch mehrmaliges Zentrifugieren stellte sich das gewünschte Probenvolumen ein.

## **9.4 Proteingrößenbezogene Gelfiltration**

Sephadex G-150 wurde zur proteingrößenbezogenen Einengung der Probe verwendet. Das Gel bildet beim Erstellen der Säule multiple Poren eines festen Größenspektrums. Sehr kleine Proteine passieren alle Poren, wohingegen mit zunehmender Größe die Anzahl der passierbaren Poren ab- und die Passagezeit größerer Proteine somit zunimmt. Die Fraktionierung nach Proteingröße ist hier also eine Funktion der Zeit und der Porengröße. Da das Probenvolumen 2-5% des Gelvolumens nicht überschreiten durfte, kamen entsprechend große Säulen (XK 50/100, 5x100cm, XK 50/60, 5x60cm, verbunden über Silikonschläuche, Pharmacia, Uppsala, Sverige) zum Einsatz. Zur Äquilibrierung waren drei Säulenvolumina TEA/NaCl-Puffer pH 7,4 notwendig. Nach dem Einlaufen der Probe lief Puffer langsam nach. Die gelfiltrierte Probe wurde in 10 ml-Aliquota fraktioniert (Fraktionensammler LKB RediFrac, Pharmacia, Uppsala, Sverige) und die ProKatL-enthaltenden Fraktionen per Assay identifiziert und gepoolt.

## **9.5 Dialyse**

Vor der Anionenaustauscherchromatographie mußte die Probe entsalzt werden. Hierzu wurde sie in semipermeablen Membranschläuchen (molecular cut-off 12-14 kD, Spectrapor, Los Angeles, USA) gegen 3x4 l salzfreien TEA-Puffer dialysiert (für 3x12h). Bei einem Probenvolumen von 250 ml hatte sich der Salzgehalt nach Dialyse um den Faktor  $10^{-6}$  bis  $10^{-7}$  verringert, was per Konduktivitätsmessung (Digital-Konduktometer, Knick, Berlin) überprüft wurde.

## **9.6 Anionenaustauscherchromatographie und abschließende Membranfiltration**

DE-52 wurde zur proteinladungsbezogenen Anionenaustauscherchromatographie verwendet. Das Gel wurde mit TEA/NaCl-Puffer pH 7,4 in einer Chromatographiesäule (XK 50/60, 5x60cm, Pharmacia, Uppsala, Sverige) wie o.a. äquilibriert. Die gebundenen Proteine wurden mit einem ansteigenden NaCl-Gradienten (0,0 bis 0,5m NaCl) eluiert. Die per Assay identifizierten Fraktionen wurden gepoolt und evaluiert. Abschließend wurde die Probe analog zu dem unter 9.4 beschriebenen Vorgehen nochmals auf das gewünschte Endvolumen konzentriert.

## **9.7 Darstellung der Pipettierschemata der In-vitro-Aktivierungsversuche**

Die Pipettierschemata für die In-vitro-Versuche zur Aktivierung von Prokathepsin L durch ELP und PSA sind im Ergebnisteil jeweils unmittelbar vor den entsprechenden Resultaten dargestellt. Dies entspricht zwar nicht dem üblichen Vorgehen mit strikter Trennung von Material und Methoden einerseits und Ergebnissen andererseits, geschieht aber zur Vermeidung überflüssiger Unübersichtlichkeit der Darstellung. Des weiteren wurde die grundsätzliche Vorgehensweise bei den Assays im vorliegenden Kapitel ausführlich dargestellt.

# **10 GEWINNUNG VON PSA (PROSTATA-SPEZIFISCHES-ANTIGEN)**

## **10.1 Durchführung der Arbeiten und Herkunft des Ausgangsmaterial**

Die Gewinnung von aufgereinigtem PSA erfolgte in unserem Labor aus gefrorenem Sperma. Die anschließend dargestellten Reinigungsschritte wurden nur marginal vom Verfasser dieser Arbeit durchgeführt, hauptsächlich Durchführende waren der Betreuer dieser Arbeit, Herr PD Dr. Hans-Heinrich Heidtmann und die Medizinisch-Technische-Assistentin Margitta Alt, denen ich an dieser Stelle herzlich für die Bereitstellung des Materials danken möchte. Aus diesem Grund erfolgt hier nur eine kurze zusammenfassende Darstellung der Vorgehensweise, die ausführlich bei Zhang et al. 1995 nachgelesen werden kann. Das gefrorene Sperma stammt aus der Abteilung für Andrologie, Universitäts-Hautklinik der Philipps-Universität in Marburg unter

der Leitung von Herrn Prof. Dr. Krause, auch hier bedanke ich mich für die freundliche und hilfsbereite Zusammenarbeit.

## 10.2 Ablauf der Reinigung

Vergleichbar dem ausführlich dargestellten Arbeitsablauf bei der Gewinnung von Prokathepsin L aus konditionierten Zellmedien findet sich hier ein mehrschrittiges Vorgehen unter Verwendung mehrerer Methoden der Volumeneinengung und Proteinseparation:

- ⇒ Gewinnung von Seminalplasma aus dem gefrorenen Sperma durch Zentrifugation,
- ⇒ Präzipitation unerwünschter Bestandteile mit Ammoniumsulfat und Weiterverarbeitung des Überstands,
- ⇒ Gelfiltration des Überstands über eine Phenylsepharose-Säule und Elution des an das Gel gebundenen PSA mit einem ansteigenden Gradienten eines Tris-HCl-Puffers, Poolen der Fraktionen mit spezifischer Aktivität,
- ⇒ Konzentration der gepoolten Aktivität mit solidem Ammoniumsulfat, Zentrifugation zur Phasentrennung,
- ⇒ Gelfiltration zur Separation des Zielproteins von anderen Bestandteilen über ein Sephacryl S-200-Gel, Identifikation der Fraktionen mit spezifischer Aktivität (zunächst noch kein Poolen)
- ⇒ Evaluation des Reinheitsgrades der Fraktionen mit PSA-Aktivität per Gelelektrophorese in einem 12,5%igen SDS-Gel, anschließendes Poolen reiner Fraktionen,
- ⇒ optional kann abschließend zum Erreichen eines höheren Reinheitsgrades eine zusätzliche Anionenaustauscherchromatographie durchgeführt werden, die Fraktionen mit spezifischer Aktivität werden gegen einen 10 mM Tris-HCl-Puffer dialysiert, gepoolt und aliquotiert bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

Der Nachweis der spezifischen Aktivität erfolgt entweder im Mikrotiterplattenassay durch das Verhältnis von Aktivität zu Protein (Substrat S-2586 Arg-Pro-Tyr-pNA, Bachem, Heidelberg) oder genauer in der SDS-Gelelektrophorese nach Inkubation mit einem Überschuß an Antichymotrypsin. Dieses Protein mit einem Molekulargewicht um 60 kD bindet aktives PSA (30 kD) zu einem SDS-stabilen Komplex von 90 kD. Da nur aktives PSA komplexiert wird korreliert die Stärke der nicht-komplexierten PSA-Bande dem Anteil nicht-aktiven Enzyms.

## 11 PKatL OHNE UND MIT ENZYMEN IM AKTIVIERUNGSASSAY

Prokathepsin L wurde hauptsächlich im Aktivierungsassay pH 3,0/5,5 eingesetzt. Hierzu wurde folgendermaßen vorgegangen:

- ⇒ Einsatz ohne weitere Enzyme zur Evaluation der optimalen Aktivierungsparameter,

- ⇒ Einsatz mit Humaner Leukozyten-Elastase (HLE) zur Evaluation der möglichen Aktivierungsparameter,
- ⇒ Einsatz mit Prostata-Spezifischem-Antigen (PSA) zur Evaluation der möglichen Aktivierungsparameter.

### 11.1 Optimierung der In-Vitro-Aktivierung von Prokathepsin L ohne weitere Enzyme

Die durch den dargestellten Reinigungsvorgang gewonnene Probe wurde zunächst alleine unter verschiedenen Aktivierungsbedingungen im pH-5,5-Assay (nach vorheriger Aktivierung bei pH 3,0) untersucht. Es sollte die mindestens notwendige Enzymmenge identifiziert werden, mit der sich in diesem Assay reproduzierbare Meßergebnisse erzielen lassen. Des weiteren sollten die notwendige Vorinkubationsdauer ( $t_{\text{Vor}}$ ) und das günstigste Inkubationsverhältnis von Probe zu Aktivierungspuffer (APu) ermittelt werden. Grundprämisse war die Bestrebung neben validen Meßergebnissen einen möglichst geringen Probeneinsatz gewährleisten zu können.

**Tabelle 11.1 Parameter der In-Vitro-Aktivierung von PKatL im Aktivierungsassay**

	Parameter		
	PKatL ( $\mu\text{l}$ )	PKatL/APu	$t_{\text{Vor}}$ (min)
Variationsbreite	10, 15 20, 25, 30, 35, 40	1:10, 1:5, 1:3, 1:2, 1:1, 1:0,5	5, 15, 20, 25, 30

### 11.2 Optimierung der In-vitro-Aktivierung von Prokathepsin L mit HLE

Die Versuche zur proteolytischen Aktivierung von Prokathepsin L (im weiteren PKatL) per enzymatischer Spaltung durch HLE wurden unter Verwendung des fluorometrischen KatL-Assays bei pH 5,5 durchgeführt. PKatL wurde vor der Messung im Assay bei 37,5 °C mit HLE inkubiert. Die Parameter der Vorinkubation wurden variiert, um das optimale Aktivierungsniveau zu eruieren: Verhältnis von Proenzym zu aktivierendem Enzym (PKatL/HLE=Enzymansatz), Verhältnis Enzymansatz zum Aktivierungspuffer (PKatL + HLE/APu=Gesamtansatz), Dauer der Vorinkubation, pH-Wert der Vorinkubation. Da die notwendige Variationsbreite der Parameter nicht bekannt war, wurde zunächst nach dem unten angegebenen Muster vorgegangen. Sollten die optimalen Aktivierungsergebnisse mit Variationen außerhalb der geplanten Bereiche erzielt werden, so wäre das Muster in die entsprechende Richtung zu erweitern gewesen.

**Tabelle 11.2 Parameter der In-vitro-Aktivierungsversuche von ProkathepsinL und HLE**

	Parameter			
	PKatL/HLE	PKatL+HLE/APu	t (min)	pH

Variationsbreite	1:10, 1:5, 1:3, 1:2, 1:1	1:10, 1:5, 1:3, 1:2, 1:1, 1:0,5	10, 15, 20, 25, 30, 45, 60	6,0, 6,5, 7,0, 7,5
------------------	-----------------------------	------------------------------------	-------------------------------	--------------------

Der Grundassay dieser Variationen ist in 9.1.2.2 dargestellt, ebenso alle weiteren Ansätze (Standardansatz zum Kalibrieren des Fluoreszenzspektrometers, Positivkontrollen). Zum Ausschluß einer direkt HLE-bedingten Substrataktivierung wurden auch Doppelansätze ohne PKatL durchgeführt und mitgemessen.



## ERGEBNISSE

### 12      Aufreinigung des konditionierten Mediums

#### 12.1    Quantitative Veränderungen der Probe im Aufreinigungsprozeß

Durch die im Abschnitt „Material und Methoden“ dargestellten Verfahren der Aufreinigung des konditionierten Mediums wurden Proteingehalt, enzymatische KatL-Aktivität und SCCA-Gehalt von Schritt zu Schritt methodenabhängig starken Veränderungen unterworfen. Diese waren in quantitativer Art und dienten der Gewinnung einer konzentrierten PKatL-Probe mit hoher Reinheit, die so wenig andere Proteine (oder andere Verunreinigungen) wie möglich enthält. Dies war im Hinblick auf die Validität der in den anschließenden Aktivierungsversuche in den entsprechenden Assays erhobenen Ergebnisse von grundsätzlicher Bedeutung, um Verfälschungen der Messungen durch PKatL-unabhängige Einflußgrößen so weit wie möglich zu minimieren. Nichtsdestotrotz wurde das Ausgangsmaterial durch die verschiedenen Schritte während des Reinigungsprozeß starken Veränderungen unterworfen, so daß eine genaue Evaluation von Schritt zu Schritt auch zum frühzeitigen Erkennen fehlerhafter Abläufe wichtig war. Als Parameter dieser Evaluation dienten

- ⇒ das Gesamtprobenvolumen (das nicht zu hoch sein sollte, um das Zielprotein Prokathepsin L in akzeptabler Konzentration zu erhalten),
- ⇒ der Gesamtproteingehalt (ebenfalls aus Gründen der Konzentration, aber auch um abschätzen zu können, um welchen Prozentsatz die Ausgangsproteinmenge im Verlauf reduziert werden konnte),
- ⇒ die spezifische Aktivität des Zielproteins Prokathepsin L (um übermäßige Verluste spezifischer Aktivität durch einen Reinigungsschritt zu erkennen und entsprechend korrigierend eingreifen zu können),
- ⇒ die spezifische Aktivität des Prokathepsin-L-Inhibitors SCCA (Squamous Cell Carcinoma Antigen, um den Einfluß dieses von verschiedenen Bronchialkarzinomzelllinien unter Stimulationsbedingungen verstärkt gebildeten Stör- und Einflußfaktor auf die späteren Assayergebnisse einschätzen zu können).

Aus diesen Parametern ließ sich von Schritt zu Schritt der Yield (verbleibender Anteil in Prozent bezogen auf den Ausgangswert) bestimmen, der ineffektive oder gar schädliche Reinigungsschritte (z.B. durch übermäßigen Verlust spezifischer Aktivität) identifizierte. In der folgenden Tabelle sind diese Parameter für jeden einzelnen Reinigungsschritt aufgeführt. Zur besseren Veranschaulichung sind die Verläufe anschließend graphisch aufeinander bezogen und erläutert.

**Tabelle 12.1 Entwicklung der Evaluationsparameter im Verlauf der Aufreinigung**

Methode	Vol (ml)	OD <sub>280</sub>	Proteingehalt		KatL-Aktivität		SCCA		Yield (%)		
			Mg/ml	Mg <sub>G</sub>	mU/ml	mU <sub>G</sub>	ng/ ml	ng <sub>G</sub>	Prot	KatL	SCC
ZK <sup>1</sup>	1500	0,712	0,712	1068	0,81	1225	1,2	1800	100	100	100
AChro <sup>1</sup>	1600	0,572	0,572	915,2	0,86	1386			86	130	
MF I <sup>1</sup>	80	2,631	2,631	210,5	6,6	533	37,6	3008	20	38	167
GF I <sup>2</sup>	240	0,027	0,027	6,5	2,3	560	1,5	360	0,6	46	20
MD <sup>2</sup>	240	0,027	0,027	6,5	1,2	296			0,6	24	
GF II <sup>2</sup>	50	0,042	0,042	2,1	8,7	435	0,8	40	0,2	36	2,2
MF II <sup>2</sup>	2,1	*	*	*	366	768				48	

ZK: Zellkultur (hier: Wannenstapel), AChro: Affinitätschromatographie zum Entfernen des BSA, MF I/II: 1./2. Membranfiltration zur Volumeneinengung, GF I: 1.Gelfiltration zur proteingrößenbezogenen Einengung, MD: Membrandialyse zur Entsalzung, GF II: 2. Gelfiltration zur proteinladungsbezogenen Einengung, G: Gesamt; \*: zur Probenersparnis wurde auf weitere Bestimmungen verzichtet.

Quantitativ betrachtet ergaben sich vom Ausgangsmaterial, dem konditionierten Medium, bis zur Endprobe der Reinigung folgende prozentualen Veränderungen. Diese stellen die Reduktion in Volumen, Proteingehalt, SCCA-Gehalt und gleichzeitig den Erhalt spezifischer Aktivität des Zielenzyms dar.

**Tabelle 12.2 Prozentuale Veränderungen von Volumen, Proteingehalt, KatL-Aktivität und SCCA-Gehalt im Verlauf der Aufreinigung**

Parameter	Volumen	Proteingehalt	KatL-Aktivität	SCC-Gehalt
Reduktion (%)	99,86	99,86	37,3	97,8
Verbleib (%)	0,14	0,14	62,7	2,2

Absolut ergab sich eine Reduktion des Probenvolumens des Ausgangsmaterial um fast den Faktor 100, entsprechend verhielt es sich mit dem Protein- und SCCA-Gehalt. Dies bedeutet, daß unspezifische Störfaktoren signifikant reduziert werden konnten. Gleichzeitig gingen in der gesamten Reinigung nur etwa ein Drittel der spezifischen Enzymaktivität des Zielproteins PKatL verloren. Bevor die Verläufe genauer dargestellt werden noch eine Anmerkung zur Darstellung in der Verlaufstabelle. Die Werte für die gemessene enzymatische Aktivität wurden auf den Ausgangswert von 1225 mU bezogen. Durch die Entfernung spezifischer (SCCA) und unspezifischer Inhibitoren des Zielenzyms (z.B. bovines Serumalbumin) nahm die gemessene enzymatische Aktivität je nach Reinigungsstufe zu- oder ab. Dies begründet sich in der methodenabhängigen Konzentration oder Entfernung der Inhibitoren. So nahm die

Konzentration von SCCA bis zur ersten Membranfiltration zu, erst anschließend erfolgte eine Reduktion. Prinzipiell nahm der Gesamtgehalt inhibierender Bestandteile der Probe im weiteren Reinigungsverlauf deutlich ab und entsprechend stand mehr PKatL zur Aktivierung im Assay zur Verfügung. Daher wurde ab der ersten Gelfiltration auf ein sensibleres Assayverfahren zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität gewechselt, das die Gesamtaktivität besser erfaßt. Weil dieser Assay aber in den ersten Reinigungsstufen anfälliger für Inhibitoren ist wurde zunächst der robustere KatL-Assays bei pH 3,0 verwendet. In der Berechnung des Yield kann das Ergebnis der Probe GF I gleich 100 Prozent gesetzt werden, um die nach Verfahrenswechsel gewonnenen Ergebnisse auf diesen Ausgangswert zu beziehen (Pfeil)

**Tabelle 12.3 Modifizierte tabellarische Darstellung der Parameter aus Tabelle 12.1**

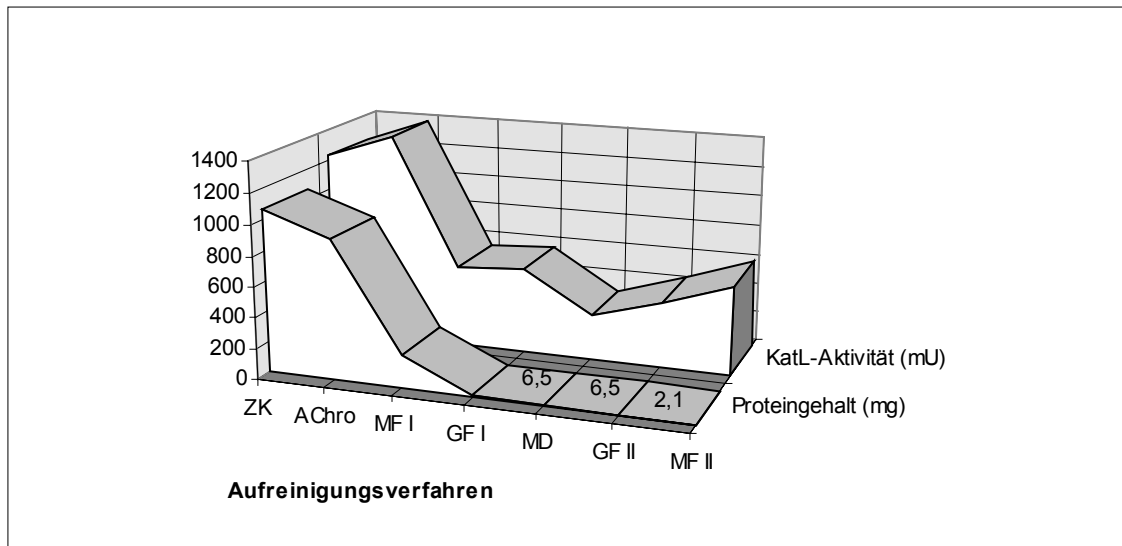
Methode	KatL-Aktivität		Yield (%)
	MU/ml	mU <sub>G</sub>	KatL
ZK <sup>1</sup>	0,81	1225	100
AChro <sup>1</sup>	0,86	1386	130
MF I <sup>1</sup>	6,6	533	38
GF I <sup>2</sup>	2,3	560	100 ←
MD <sup>2</sup>	1,2	296	53
GF II <sup>2</sup>	8,7	435	78
MF II <sup>2</sup>	366	768	137

Dieses Vorgehen ist bei stattgehabtem Verfahrenswechsel zwar sachlich korrekter, dient aber im Endeffekt nicht einer besseren Übersichtlichkeit in der Darstellung. Daher favorisiere ich aus pragmatischen Gründen die Tabelle zu Beginn des Abschnitts.

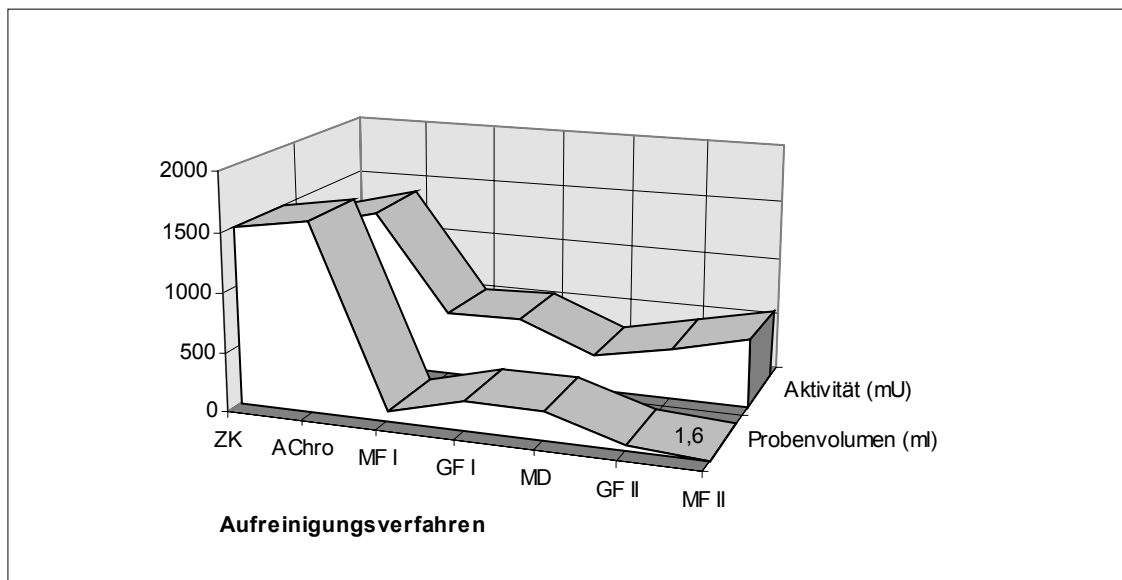
Im Folgenden habe ich zur besseren Veranschaulichung der Daten aus Tabelle 12.1 die Parameter graphischer dargestellt. Das Diagramm bezieht die spezifische Enzymaktivität als bedeutendsten Zielparame-ter auf den Gesamtproteingehalt. Es zeigt sich, daß bei kontinuierlich abnehmendem Gesamtproteingehalt die spezifische Aktivität deutlich weniger abnahm. Als Reinigungsschritt mit der quantitativ effektivsten Proteinreduktion erscheint die erste Membranfiltration, die aber gleichzeitig auch den ausgeprägtesten Verlust an Zielenzym verursachte. In der ursprünglichen Vorgehensweise wurde zur Volumeneinengung die Minitan-Konzentrationszelle verwendet. Im ersten Reinigungsdurchgang fanden sich hiermit ausgeprägtere Verluste spezifischer Aktivität (bis zur Hälfte des Ausgangsbestands), so daß ich auf das weniger verlustanfällige Centriprep-System wechselte. Nichtsdestotrotz scheint dieser frühe Reinigungsschritt grundsätzlich verlustträchtig zu sein. Ähnlich verhält es sich, wenn man

die spezifische Aktivität in bezug zum Probenvolumen betrachtet. Auch hier hatte die erste Membranfiltration den quantitativ ausgeprägtesten Effekt.

**Diagramm 12.1 KatL-Aktivität und Proteingehalt im Aufreinigungsprozeß**

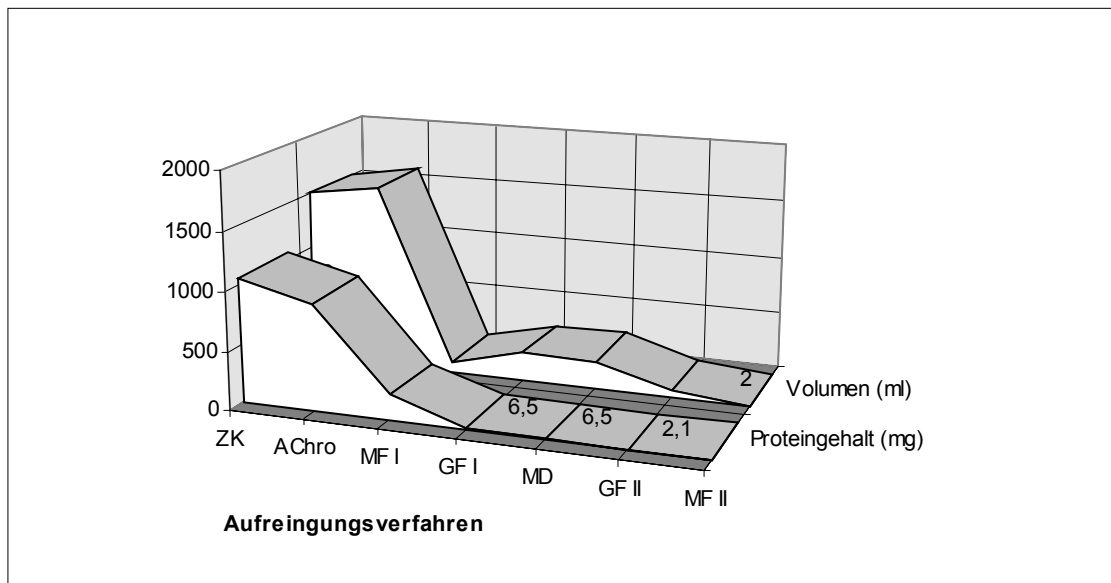


**Diagramm 12.2 Probenvolumen und KatL-Aktivität im Aufreinigungsprozeß**



Schließlich zeigt die Gegenüberstellung von Probenvolumen und Proteingehalt die fast durchgehende Reduktion dieser beiden Evaluationsparameter von Schritt zu Schritt.

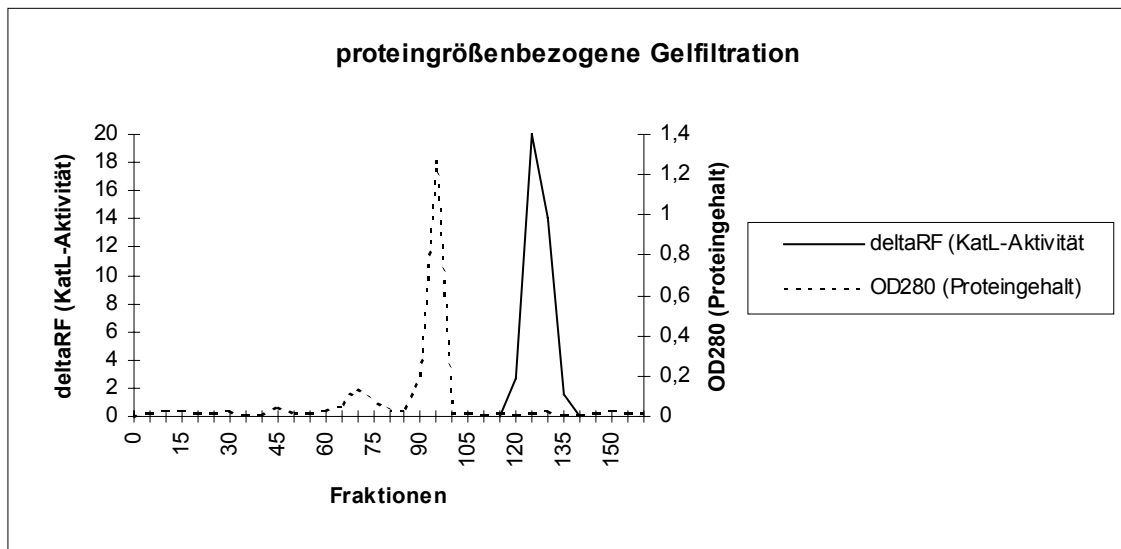
**Diagramm 12.3 Probenvolumen und Proteingehalt im Aufreinigungsprozeß**



## 12.2 Meßergebnisse der Gelfiltrationen

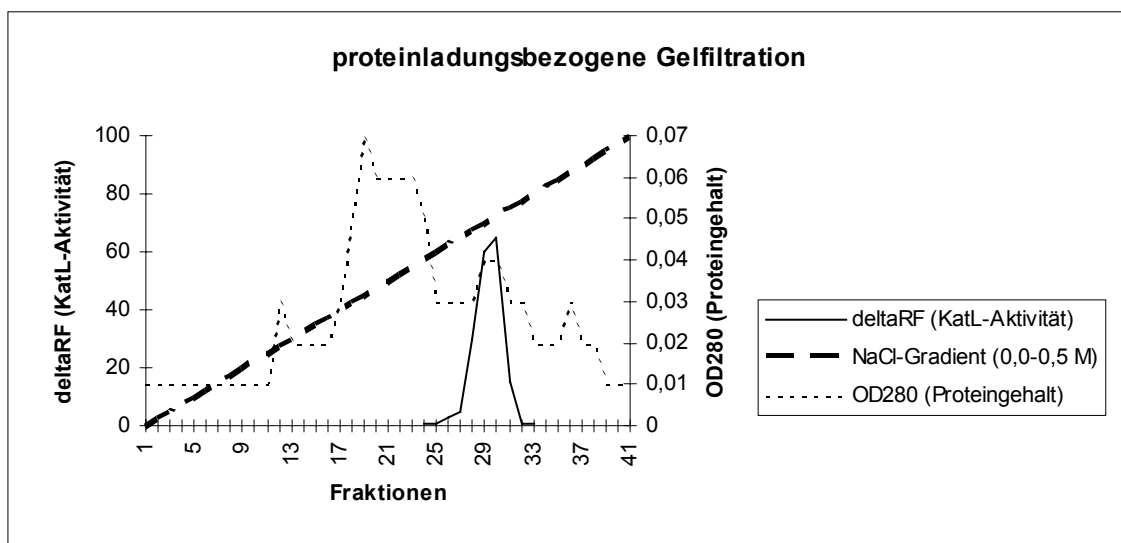
Neben der Volumeneinengung stellte die Separation des Zielenzyms von anderen Proteinen der Probe ein Problem dar, da einerseits eine möglichst vollständige Trennung des Zielproteins von den anderen Eiweißbestandteilen der Probe angestrebt werden sollte, dies aber andererseits (desto näher man z.B. im Bereich des Molekulargewichts den „cut-off“ am Bereich des PKatL legt) mit der Gefahr des Verlusts auch von PKatL verbunden war. Hier ermöglichten die Gelfiltrationsverfahren (bezogen auf Proteingröße und -ladung) eine Trennung. Es entstand nicht nur eine im Gesamtproteingehalt massiv reduzierte Probe, sondern auch qualitativ reineres Material, da viele Proteine, deren Größe sich von Prokathepsin L unterscheidet, komplett entfernt wurden. Auf diese Weise konnte die im spezifischen Western Blot gezeigte hohe Reinheit der Endprobe erreicht werden. Im Folgenden ist der Probendurchlauf durch die proteingrößenbezogene Gelfiltrationssäule G150 dargestellt. Der Auslauf wurde in Fraktionen von 8 ml gesammelt, die dann einzeln auf Proteingehalt (OD280-Methode) und PKatL-Aktivität (pH-3,0-Assay) untersucht wurden. Nach der Identifikation der Fraktionen mit spezifischer Enzymaktivität wurde gepoolt (die Restprobe ging nicht in die weitere Aufreinigung ein). Auf diese Weise konnte in diesem frühen Reinigungsschritt eine qualitative Veränderung der Probenzusammensetzung erreicht werden, ein großer Teil des im Gesamtdurchlauf enthaltenen Protein fand somit keinen Eingang in die weitere Reinigung.

**Diagramm 12.4 Proteingehalt und KatL-Aktivität im G-150-Durchlauf**



Der zweite Schritt der Separation des PKatL vom Restproteinbestand bestand in der proteinladungsbezogenen Gelfiltration (DE-52-Säule). Zuvor wurde die Probe über Spectrapor-Dialyseschläuche gegen salzfreien Puffer dialysiert und entsalzt. Dies war notwendig, da das an die Gelsäule gebundene PKatL und mit einem ansteigenden NaCl-Gradienten eluiert wurde (die kationischen Proteine lassen sich je nach Molarität des NaCl-Puffers ablösen). Eine stark salzhaltige Probe hätte die Elution beeinträchtigen können.

**Diagramm 12.5 Proteingehalt und KatL-Aktivität im DE-52-Eluat**



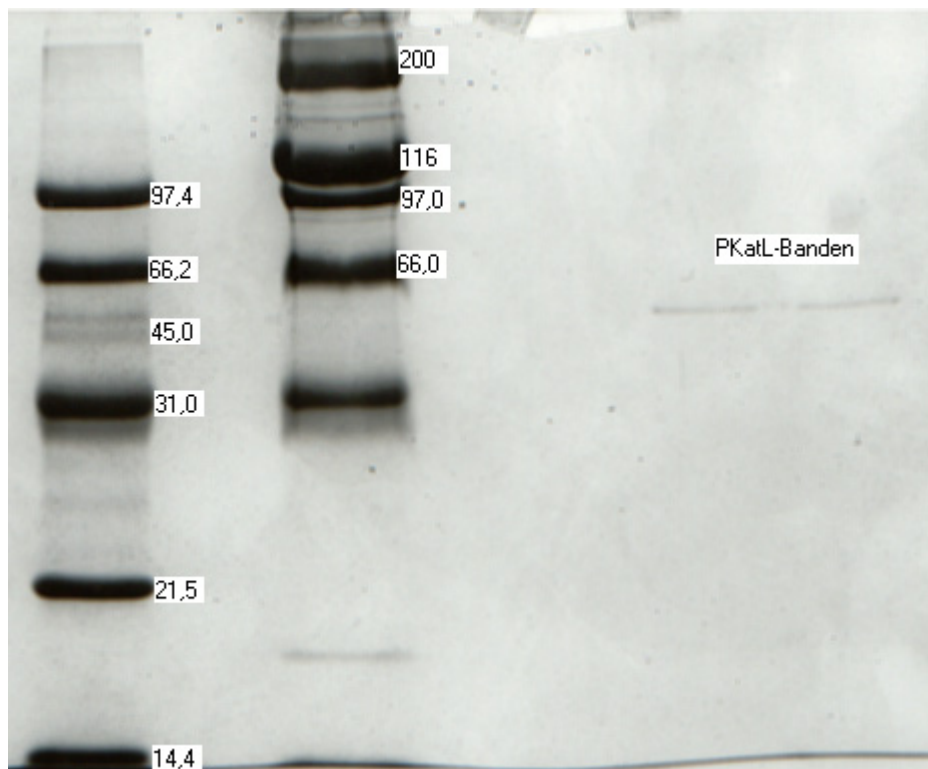
### 12.3 Evaluation der Reinheit der Endprobe in SDS-PAGE und Western Immunoblot

Nach der in „Material und Methoden“ beschriebenen Vorgehensweise wurde die aufgereinigte Probe in der SDS-PAGE eingesetzt. Als Größenmarker wurden auf Bahn 2 (Banden ganz links im Bild) des 10 Bahnen umfassenden Trenngels ein niedermolekularer Marker (low molecular weight marker, lmwm) und auf Bahn 4 (zweite Bandenbahn von links) ein hochmolekularer Marker (high molecular weight marker, hmwm) aufgetragen. Die Zahlen neben den Banden der Marker geben das Molekulargewicht des jeweiligen Markerproteins in Kilodalton (kD) an. Je 10 µl der PKatL-Endprobe wurden mit je 10 µl nichtreduzierendem SDS-Probenpuffer auf Bahn 7 und 8 aufgetragen (singuläre Banden rechts im Bild).

**Tabelle 12.4 Bahnenbelegung der SDS-PAGE der PKatL-Endprobe**

	Bahn								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Inhalt	Ø	10 µl lmwm	Ø	10 µl hmwm	Ø	Ø	je 10 µl PKatL- Endprobe		Ø
belegte Bahnen jeweils + 10 µl SDS-Probenpuffer									

**Photo 12.1 SDS-PAGE der PKatL-Endprobe**



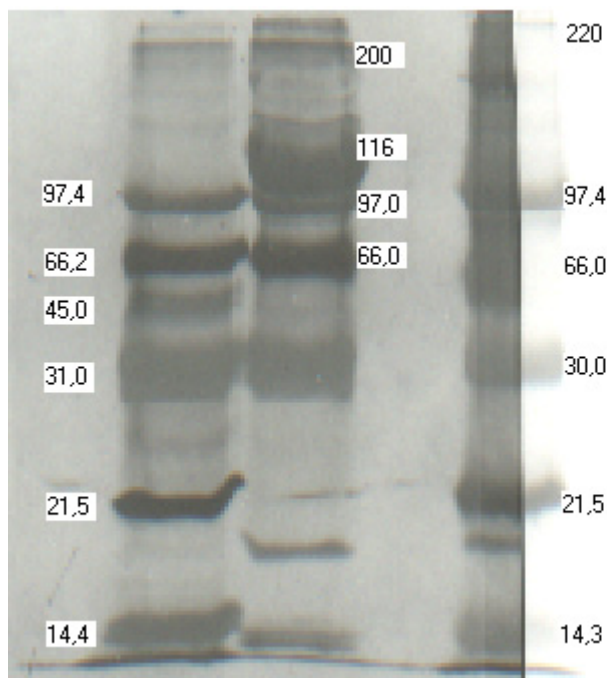
Im Photo des SDS-Trenngels zeigen sich auf den Bahnen 7 und 8 singuläre Banden in einem Molekulargewichtsbereich um 45 kD. Hier wurde die hochgereinigte Endprobe aufgetragen, die nur noch PKatL enthalten soll. Es finden sich keine weiteren Proteinbanden. Dies bestätigt den hohen Reinheitsgrad der Probe (Reduktion des Proteingehalts um 99,86 %).

Im Western Immunoblot mit spezifischen Antikörpern gegen PKatL (deren Zielepitop auch im aktiven KatL vorhanden ist und entsprechend vom Antikörper erkannt wird) wurde nun der Nachweis erbracht, daß es sich bei den beiden dargestellten Banden tatsächlich um PKatL handelte. Zunächst wurde wieder eine SDS-PAGE angefertigt, bei der man links im Bild auf Bahn 1 und 2 die gleichen Proteinmarker wie auf Photo 12.1 findet. Auf Bahn 4 wurde als spezieller Marker für den Blotvorgang Rainbow molecular weight protein marker (Rmwm) aufgetragen. Auf Bahn 6 und 7 kamen je 10 µl PKatL-Endprobe nach Aktivierung mit pH-3,0-APu (und mit jeweils 10 µl SDS-Probenpuffer) zum Einsatz. Nach der PAGE wurde das Trenngel längs in der Mitte der Rmwm-Bahn geteilt. Der linke Teil wurde Coomassie gefärbt, mit dem rechten Teil wurde wie beschrieben eine Western Immunoblot mit spezifischen Antikörpern gegen PKatL durchgeführt.

**Tabelle 12.5 Bahnenbelegung des Western Immunoblot gegen KatL, spezifischer und Kontrollblot**

	Bahn								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Inhalt	10 µl lmwm	10 µl hmwm	Ø	10 µl Rmwm	Ø	je 10 µl PKatL-Endprobe nach Vorinkubation mit 10 µl pH-3,0-APu			Ø
	belegte Bahnen jeweils + 10 µl SDS-Probenpuffer								

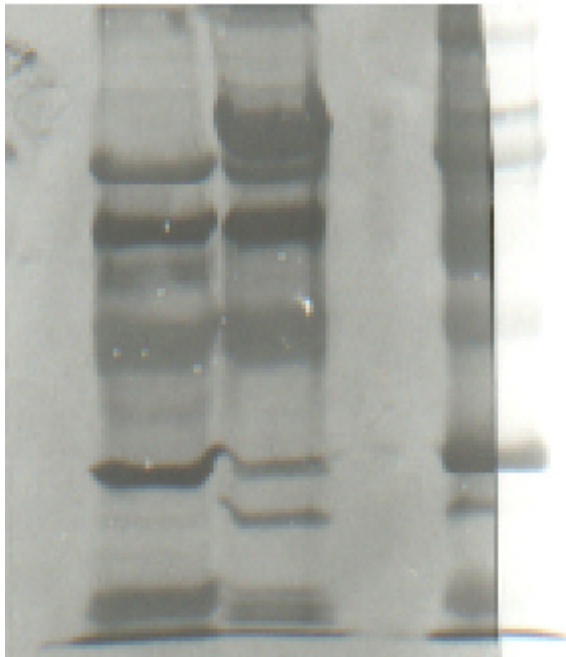
**Photo 12.2 Western Immunoblot gegen KatL der PKatL-Endprobe, spezifischer Blot**





Im geblotteten rechten Teil erkennt man bei etwa 25 bis 27 kD zwei Banden. Hier haben die spezifischen anti-PKatL-Antikörper ihr Zielepitop erkannt und gebunden. Nochmals angemerkt sei, daß sich dies im Bereich der Aminosäuresequenz befindet, der nach Proteolyse der Proregion im aktiven KatL vorhanden ist. Zum Abschluß folgt die Darstellung des Kontrollblots, bei dem als Erstantikörper Rb-anti-nIgG verwendet worden war.

**Photo 12.3 Western Immunoblot gegen KatL der PKatL-Endprobe, Kontrollblot**



Da die verwendeten Größenmarker exakt der Anordnung im spezifischen Blot entsprechen wurden sie im vorliegenden Kontrollblot nicht noch einmal gesondert bezeichnet und mit Molekülgröße beschriftet. Die im spezifischen Blot bei etwa 25 bis 27 kD sichtbaren Banden stellten sich im Kontrollblot nicht dar. Damit konnte folgendes nachgewiesen werden:

- ⇒ bei den im SDS-Gel bei 45 kD dargestellten Banden handelt es sich um PKatL,
- ⇒ bei den im spezifischen Blot dargestellten Banden um 25 kD handelt es sich um aktiviertes Enzym, also um KatL,
- ⇒ die fehlende Darstellung irgendwelcher anderer Banden bestätigt den hohen Reinheitsgrad der PKatL-Endprobe.

### 13 PKatL OHNE UND MIT ENZYMEN IN AKTIVIERUNGSASSAY UND BLOT

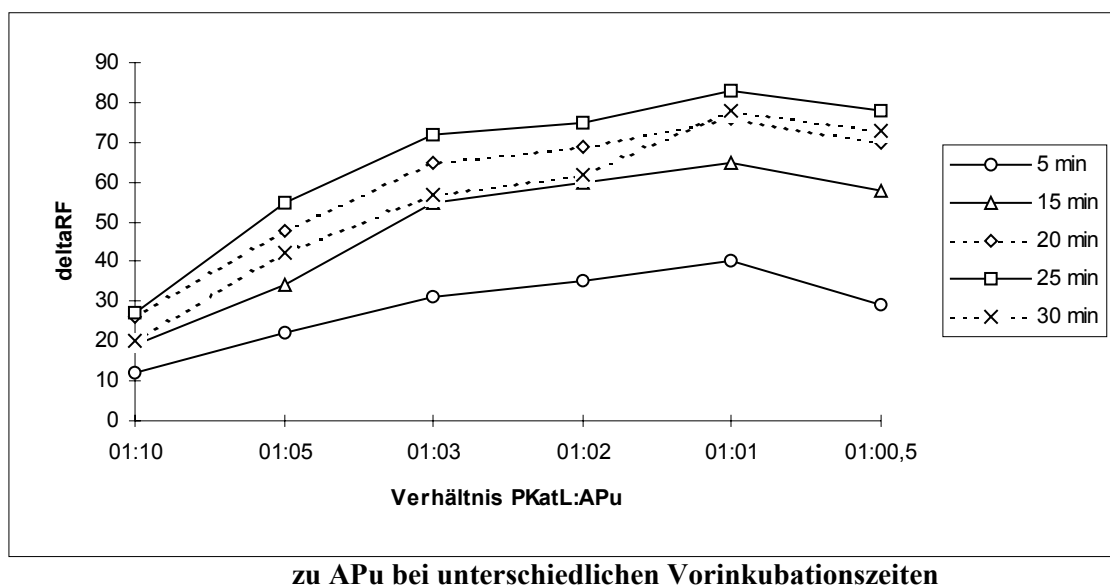
#### 13.1 Ergebnisse der Optimierung der In-Vitro-Aktivierung von Prokathepsin L

Nach Erstellung einer reinen Probe und Dokumentation im Western Blot wurden Fragen nach dem optimalen Probeneinsatz im Aktivierungsassay bearbeitet. Die Probenmenge sollte ausreichen, um valide und reproduzierbare Meßergebnisse zu erzielen und gleichzeitig bei begrenzter Probenmenge möglichst klein sein. Weiterhin war die günstigste Vorinkubationszeit im Aktivierungspuffer zu eruieren. Schließlich sollte das günstigste und zugleich praktikable Verhältnis von Probe zu APu in der Vorinkubation ausgeleuchtet werden: je 10 µl PKatL wurden im Verhältnis von 1:10, 1:5, 1:3, 1:2, 1:1 und 1:0,5 mit pH-3,0-APu vorinkubiert. Die Vorinkubationszeit variierte von 5 über 15, 20 bis 30 Minuten.

**Tabelle 13.1 In-Vitro-Aktivierung von PKatL in unterschiedlichen Relationen zu APu bei unterschiedlichen Vorinkubationszeiten**

PKatL (µl)	PKatL/APu	Vorinkubation (min)
10	1:10, 1:5, 1:3, 1:2, 1:1, 1:0,5	5, 15, 20, 25, 30

**Diagramm 13.1 In-Vitro-Aktivierung von PKatL in unterschiedlichen Relationen**



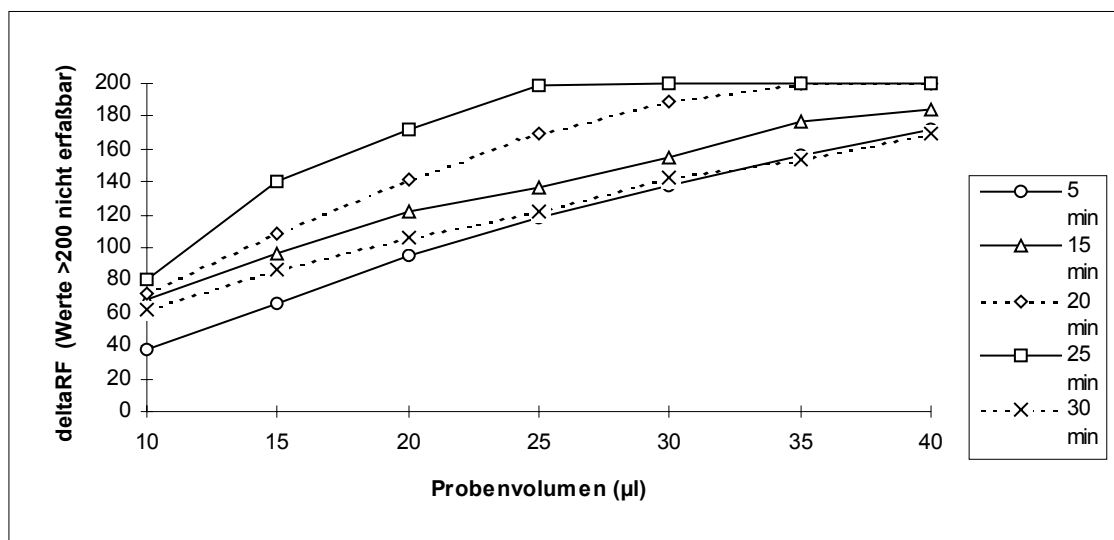
Aus den Kurvenverläufen ging hervor, daß in den Relationen von 1:5 über 1:3, 1:2 (Überschuß an Puffer), 1:1 (gleiche Mengen) bis hin zu 1:0,5 (Überschuß an Probe) ähnliche Ergebnisse erzielt werden konnten. Lediglich bei einem Verhältnis von 1:10 wichen die Werte deutlicher nach unten ab. Dies bedeutete, daß ein relativ weit gefaßter Relationsbereich in der praktischen Durchführung des Assays möglich ist. Pragmatischerweise erschienen Verhältnisse zwischen 1:3 bis 1:0,5 am geeignetsten. Bei 1:10 wurde dagegen das Volumen des Voransatzes schon so

hoch, daß diese Relation auch aus assaytechnischen Gründen nicht zu favorisieren war. Gleichzeitig ließen sich schon Tendenzen bezüglich der optimalen Vorinkubationszeit ablesen, denn über 25 Minuten Vorinkubation fielen die kontinuierlich ansteigenden Meßwerte wieder langsam ab, was wohl auf die kurze Halbwertszeit des aktivierten Enzyms zurückzuführen ist. Für die weiteren Fragen wurde eine feste Relation zwischen Enzym und Puffer von 1:3 gewählt. Im Vordergrund stand nun bei Variation der angegebenen Probenmenge und die genauere Ermittlung der sinnvollen Vorinkubationszeit. Da wie oben angegeben eine Vorinkubationszeit über 25 Minuten mit einem Aktivitätsabfall verbunden war, wurden längere Zeiten nicht berücksichtigt.

**Tabelle 13.2 KatL-Aktivität im Aktivierungsassay unter Variation von Vorinkubationsdauer und Probeneinsatz**

PKatL (µl)	PKatL/APu	Vorinkubation (min)
10, 15, 20, 25, 30, 35, 40	1:3	5, 15, 20, 25, 30

**Diagramm 13.2 KatL-Aktivität im Aktivierungsassay unter Variation von Vorinkubationsdauer und Probeneinsatz**



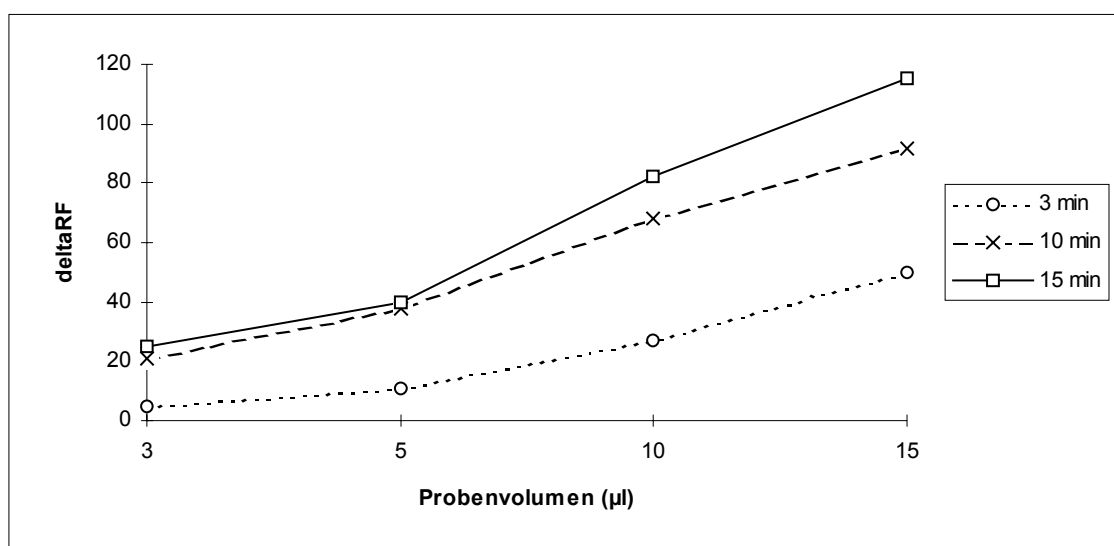
Es zeigte sich wie beim Vorversuch, daß schon bei einer Probenmenge von 10 µl unabhängig von der Vorinkubationsdauer Meßergebnisse erzielt wurden, die deutlich im Meßbereich (der einen deltaRF-Bereich von 0-200 umfaßt) lagen. Bei 25-30 µl lagen die Ergebnisse zunehmend im oberen Meßbereich, der bei einer gleichzeitigen Vorinkubationszeit von 25 Minuten oder länger überschritten wurde („Overflow“-Bereich). Eine gedankliche Extrapolation der Graphen zeigt, daß in Abhängigkeit von der Vorinkubationsdauer auch bei niedrigerem Probeneinsatz der obere Meßbereich erreicht werden könnte. Da im weiteren aber vor allem der qualitative

Nachweis einer Aktivierung von PKatL zu KatL interessierte, waren hohe Meßwerte nicht von übergeordneter Bedeutung. Die Messungen zeigten, daß schon bei einem Probeneinsatz um 10 µl und kurzer Vorinkubationszeit von 5 bis 10 Minuten Ergebnisse erzielt werden, die im detektierbaren Meßbereich liegen. Daher ergab sich die Frage nach den Meßergebnissen bei noch geringerem Probeneinsatz und kürzerer Vorinkubationszeit. Diese Messungen wurden mit 3, 5, 10 und 15 µl und einer Vorinkubationszeit von 3, 10 und 15 Minuten erneut durchgeführt.

**Tabelle 13.3 KatL-Aktivität im Aktivierungsassay unter Variation von Vorinkubationsdauer und Probeneinsatz**

PKatL (µl)	PKatL/APu	Vorinkubation (min)
3, 5, 10, 15	1:3	3, 10, 15

**Diagramm 13.3 KatL-Aktivität im Aktivierungsassay unter Variation von Vorinkubationsdauer und Probeneinsatz**



Auch bei einem geringen Probenensatz von 3 µl und kurzer Vorinkubationszeit von 3 Minuten konnten im Meßbereich liegende, reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden. Hierbei spielte wie in den zuvor dargestellten Versuchen nicht die absolute Höhe des Meßergebnisses die entscheidende Rolle, sondern die verlässliche Reproduzierbarkeit innerhalb des Meßbereichs. Sicherlich muß bedacht werden, daß bei dieser geringen Probenmenge der durch Pipettierungsungenauigkeiten verursachte Fehler eine zunehmende Bedeutung erfährt, aber in Anbetracht der begrenzten und sehr aufwendig erstellten Endprobe wurde ein probensparendes Vorgehen angestrebt.

Zusammenfassend kann man aus den dargestellten Versuchen zur Optimierung des Einsatzes von PKatL im Aktivierungsassay folgendes festhalten:

- ⇒ das Verhältnis von Prokathepsin L zur Menge des pH-3,0-Aktivierungspuffer im Vorinkubationsansatz kann in einem Bereich zwischen 1:5 und 1:0,5 variiert werden, die dabei erzielten Meßergebnisse liegen in vergleichbaren Bereichen,
- ⇒ die quantitativen Differenzen spielen für den qualitativen Nachweis enzymatischer Aktivität eine untergeordnete Rolle (dürfen aber nicht gleich Null gesetzt werden),
- ⇒ die eingesetzte Probenmenge kann in einem Bereich von 3 bis 20 µl variiert werden, höhere Mengen führen zu Meßwerten oberhalb des Meßbereichs, geringere Mengen sind aus pipettiertechnischen Erwägungen zu stark fehlerbehaftet,
- ⇒ die Dauer der Vorinkubation im Aktivierungsassay kann in einem Zeitbereich zwischen 3 bis 25 Minuten gewählt werden, längere Inkubationszeiten führen zu einer (durch die kurze Halbwertszeit des aktiven Kathepsin L bedingten) Aktivitätsabnahme, kürzere Vorinkubationszeiten sind bei größeren Probenzahlen arbeitstechnisch nicht praktikabel.

**Tabelle 13.4. Zusammenfassung der Optimierung des Aktivierungsassay**

PKatL/APu	PKatL-Probe (µl)	Vorinkubationszeit (min)
1:5 bis 1:0,5	3 bis 20	3 bis 25

### 13.2 Ergebnisse der Optimierung der In-Vitro-Aktivierung von PKatL mit HLE

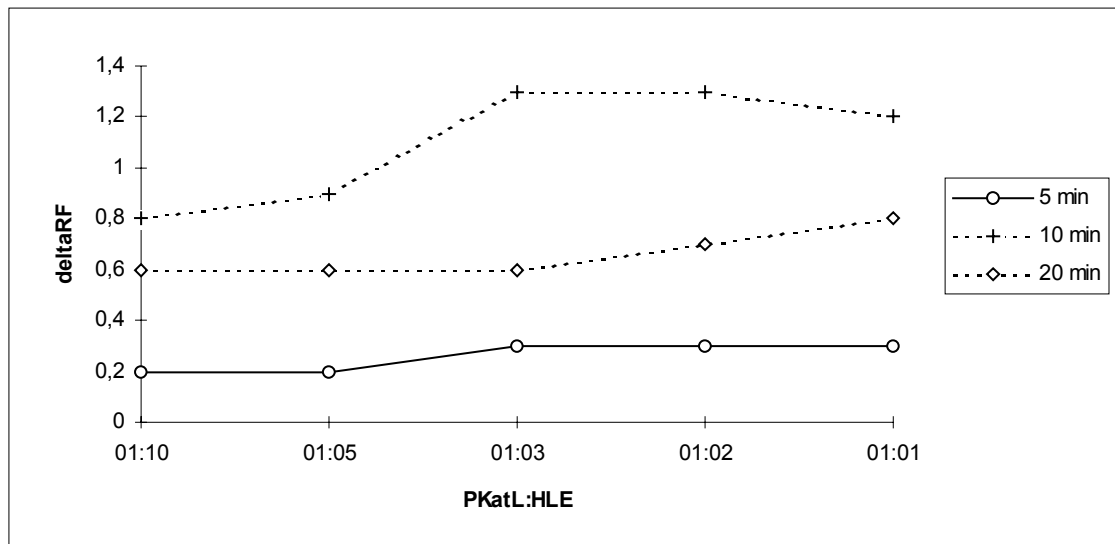
Nach Erstellung der Prokathepsin-L-Probe wurde wie dargestellt die Aktivierung des Proenzyms im Aktivierungsassay optimiert, die Bandbreite des sinnvollen Einsatz von Probenvolumen im Verhältnis zum pH-3,0-APu, das praktikable und probensparende Gesamtvolumen des Probeneinsatzes pro Assay und die günstigsten Vorinkubationszeiten ermittelt. Die prinzipiell gleichen Fragen der Optimierung des Assays wurden nun auch für den Einsatz von HLE untersucht. Insbesondere interessierten hier die folgenden assaytechnischen Fragestellungen:

- ⇒ Einsatz des Enzyms im sinnvollen Verhältnis zur Menge an HLE,
- ⇒ Einsatz von PKatL in Kombinationen von pH-3,0-Aktivierungspuffer und HLE,
- ⇒ Einsatz von PKatL und HLE bei pH-Werten um den physiologischen pH.

Um eine sinnvolle Versuchsabfolge zu gewährleisten wurde in Anlehnung an die Vorversuche HLE zunächst in verschiedenen Mengenverhältnissen bezogen auf PKatL eingesetzt: je 3 µl PKatL wurden im Verhältnis 1:10, 1:5, 1:3, 1:2 und 1:1 eingesetzt. Die von vorneherein gewählte, recht geringe Menge PKatL wurde aufgrund der dargestellten Ergebnisse zur Probenersparnis gewählt. Die Vorinkubation fand bei pH 5,5, dem pH-Wert des eigentlichen Assays statt. Gleichzeitig wurden die Vorinkubationszeiten variiert: 5, 10 und 20 Minuten (aufgrund der nach 25 Minuten schnell fallenden Aktivität wurde auf längere Vorinkubationszeiten verzichtet). Zusammenfassend ergaben sich also folgende Parameter.

**Tabelle 13.5 In-Vitro-Aktivierung von PKatL und HLE bei pH 5,5**

PKatL (µl)	pH	PKatL/HLE	Vorinkubation (min)
3	5,5	1:10, 1:5, 1:3, 1:2, 1:1	5, 10 20

**Diagramm 13.4 In-Vitro-Aktivierung von PKatL und HLE bei pH 5,5**

Die Meßwerte lagen zum Teil um den Faktor 100 niedriger als in der pH-3,0-Aktivierung. Dies lag daran, daß der für PKatL optimale pH-Bereich um 3,0 verlassen wurde, was wahrscheinlich in einer sterischen Konformationsänderung des Proteins resultiert. Da zugleich ein pH-Wert von 5,5 unterhalb des normalen Aktivitätsbereich von HLE liegt, findet sich ein weiterer suboptimaler Parameter. Aber gerade wegen dieser Hürden lieferte dieser Versuch folgende Erkenntnisse:

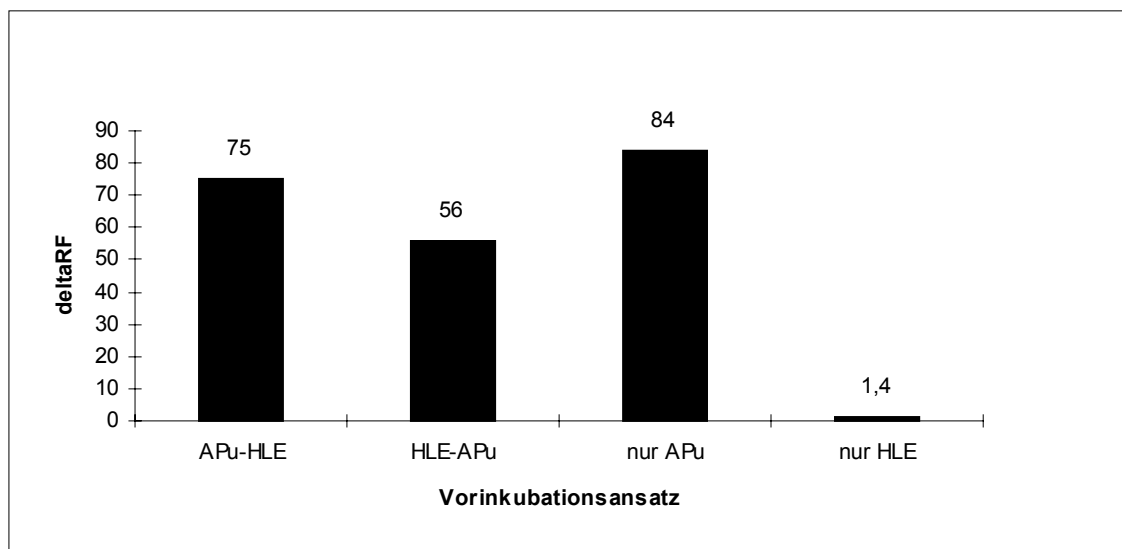
- ⇒ PKatL kann grundsätzlich von HLE aktiviert werden (zum Ausschluß einer anders gearteten Aktivierung wurde PKatL unter den gleichen Bedingungen, aber ohne HLE gemessen, was zu keinerlei Aktivität führte),
- ⇒ das Verhältnis PKatL:HLE kann in einem Bereich von 1:10 bis 1:1 variiert werden, ohne daß dies zu nennenswerten Veränderungen der Ergebnisse führt, es findet sich lediglich eine Tendenz zugunsten des Bereichs um 1:3 bis 1:2,
- ⇒ um reproduzierbar fluoreszenzspektrometrische Ergebnisse zu erhalten scheinen relativ kurze Vorinkubationszeiten (hier 5 Minuten) eher weniger geeignet, ebenso Zeiten über 20 Minuten, der günstigste Bereich scheint um 10 Minuten zu liegen.

Im nächsten Schritt wurde der sequentielle Einsatz von HLE und pH-3,0-APu im Rahmen der In-Vitro-Aktivierung von PKatL untersucht. Hierzu wurden je 3 µl PKatL im Verhältnis 1:3 zunächst für 10 Minuten mit APu, anschließend nochmals für 10 Minuten mit HLE vorinkubiert und im Assay gemessen. Ebenso erfolgte die Reihenfolge (1) 10 minütige Inkubation mit HLE (1:3) und dann (2) für die gleiche Zeit mit APu. Zur Kontrolle wurden je 3 µl PKatL 1:3 nur mit APu bzw. ELP für 20 Minuten vorinkubiert.

**Tabelle 13.6 In-Vitro-Aktivierung von PKatL und HLE bei Variation der Abfolge im Vorinkubationsansatz**

PKatL (µl)	pH	PKatL/HLE bzw. PKatL/APu	Abfolge	Vorinkubation (min)
3	5,5	1:3	HLE-APu, APu-HLE, nur APu, nur HLE	20

**Diagramm 13.5 In-Vitro-Aktivierung von PKatL und HLE bei Variation der Abfolge im Vorinkubationsansatz**



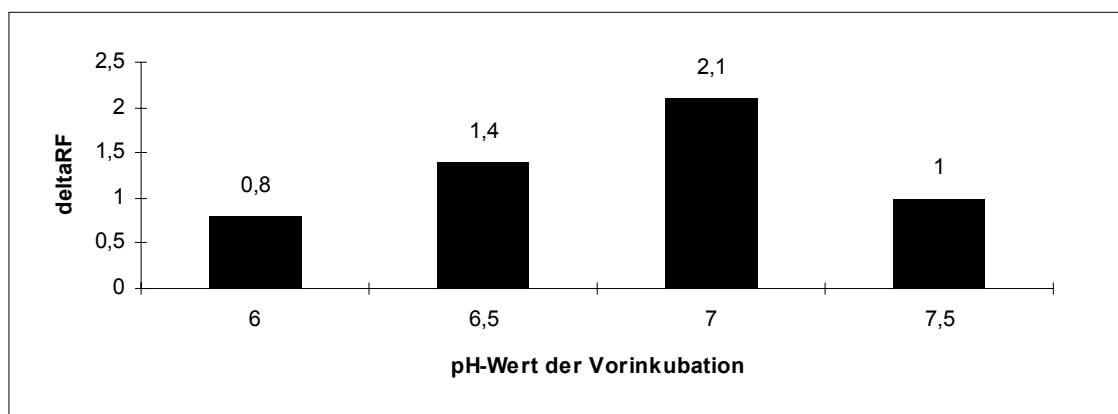
Im Balkendiagramm zeigt sich erwartungsgemäß, daß die alleinige Inkubation im pH-3,0-APu die ausgeprägteste Aktivierung brachte, wohingegen kombinierte Vorinkubationen weniger PKatL aktivieren konnten. Die Differenz zwischen „nur APu“ und „APu-HLE“ war am ehesten meßtechnisch bedingt, da beide Male PKatL 20 Minuten beim optimalen Aktivierungs-pH von 3,0 verweilte. Wie schon im zuvor dargestellten Versuch erbrachte die alleinige Vorinkubation mit HLE deutlich geringere Ergebnisse. Der pH-Wert lag wie zuvor im Assaybereich von 5,5. Zum Abschluß dieser Aktivierungsversuche wurde PKatL mit HLE bei verschiedenen pH-Werten im neutralen (also dem physiologischen Zellmilieu ähnlichen) Bereich vorinkubiert. Um

die pH-Werte einzustellen wurde im Vorinkubationsansatz 0,5 M HEPES verwendet. Zum Ausschluß unerwünschter Einflüsse dieses Puffers auf den Assay wurden die beiden Enzyme einzeln in 0,5 M HEPES des jeweiligen pH-Werts vorinkubiert und in den Assay eingebracht, was nicht zu meßbaren Aktivitätswerten führte. Ebenso beeinträchtigte HEPES alleine die Meßwerte nicht. In Anlehnung an die Vorversuche wurden je 3 µl PKatL im Verhältnis 1:3 mit HLE und 1:12 mit 0,5 molarem HEPES-Puffer (pH 6,0, 6,5, 7,0 und 7,5) vorinkubiert. Die Vorinkubationsdauer betrug 10 Minuten bei 37°C.

**Tabelle 13.7 In-Vitro-Aktivierung von PKatL und HLE bei Vorinkubation bei unterschiedlichen pH-Werten in 0,5 molarem HEPES (pH 6,0-7,5)**

PKatL (µl)	pH	PKatL/HLE	Vorinkubation (min)
3	6,0, 6,5, 7,0, 7,5	1:3	10

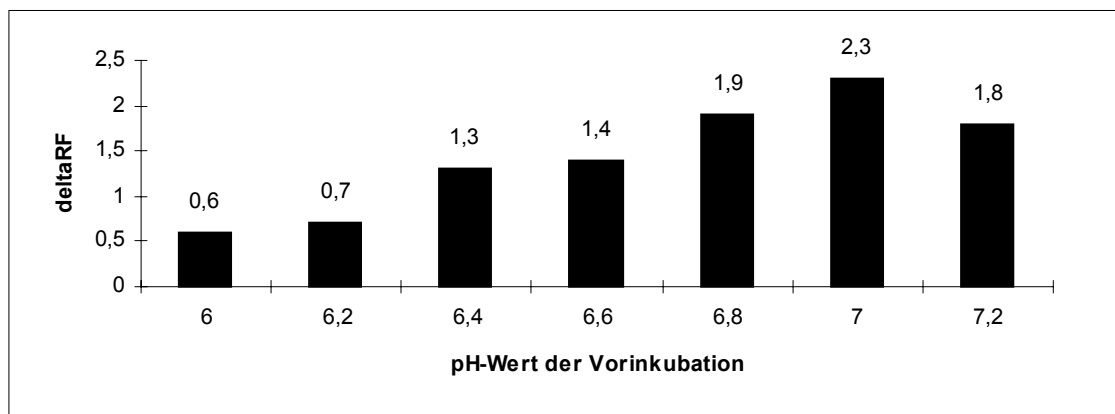
**Diagramm 13.6 In-Vitro-Aktivierung von PKatL und HLE bei Vorinkubation bei unterschiedlichen pH-Werten in 0,5 molarem HEPES (pH 6,0-7,5)**



Es zeigte sich, daß HLE auch bei pH-Werten um den neutralen Bereich in der Lage ist PKatL zu aktivieren. Hierbei scheint der pH-Bereich um 7,0 die stärkste Aktivierung zu bringen. Um das pH-Optimum besser einzugrenzen wurde der gleiche Versuch mit differenzierteren pH-Intervallen durchgeführt (pH 6,0, 6,2, 6,4, 6,6, 6,8, 7,0, 7,2).



**Diagramm 13.7 In-Vitro-Aktivierung von PKatL und HLE bei Vorinkubation bei unterschiedlichen pH-Werten in 0,5 molarem HEPES (pH 6,2-7,2)**



Bei kleineren pH-Intervallen unterhalb des physiologischen Bereichs bestätigte der optimale Wert um 7,0. Darunter und darüber kam es zu einem Abfall des Aktivierungsergebnisses.

**Tabelle 13.8 Zusammenfassung der Ergebnisse des Assay mit HLE im pH-Bereich 6,0-7,5**

PKatL (µl)	PKatL/HLE	pH-Optimum	Vorinkubation (min)
3	1:3	7,0	10

Zusammenfassend zeigte sich bei den Aktivierungsversuchen von PKatL mit HLE folgendes:

- ⇒ PKatL kann beim pH des Assays von 5,5 durch HLE aktiviert werden,
- ⇒ die Aktivierungsergebnisse bei pH 5,5 können in einem Spektrum des Verhältnisses PKatL/HLE von 1:10 bis 1:1 nachvollzogen werden, allerdings erscheint ein Verhältnis zwischen 1:1 bis 1:3 günstigere Ergebnisse zu erzielen,
- ⇒ die günstigste Vorinkubationszeit der Enzyme liegt um 10 Minuten, wie in den vorherigen Versuchen scheinen längere Zeiten (schon ab 20 Minuten) keinen steigernden Effekt auf die Aktivierung zu haben,
- ⇒ die Kombination von pH-3,0-APu und HLE in der Vorinkubation hat keinen additiven Effekt auf das Ausmaß der PKatL-Aktivierung (am ehesten, da sich dieser pH-Bereich zu weit vom pH-Optimum des HLE entfernt),
- ⇒ bei Vorinkubation von PKatL mit HLE bei über 0,5 molaren HEPES-Puffer eingestellten pH-Bereich zwischen 6,0 und 7,5 werden die besten Ergebnisse um 7,0 erzielt.

### 13.3 Ergebnisse der In-vitro-Aktivierungsversuche von PKatL mit PSA

Im Anschluß an die Aktivierungsversuche PKatL/HLE sollte eine gleiche Versuchsreihe mit PSA durchgeführt werden. Bei Aktivierbarkeit des Proenzyms durch die Protease PSA war

ebenfalls eine analog durchzuführende Optimierung der Versuchsbedingungen geplant. Doch schon zu Beginn der Versuchsreihe zeigte sich als großes Problem, daß PSA selber in der Lage ist, das für die fluoreszenzspektrometrische Messung verwendete PKatL-Substrat Z-Phe-Arg-AMC zu aktivieren. In den Kontrollassays, die ohne PKatL und nur mit Substrat und PSA vorinkubiert worden waren, zeigte sich eine meßbare Aktivität. Diese lag in etwa im Bereich der durch HLE hervorgerufenen Aktivität und zeigte auch nach gemeinsamer Vorinkubation von PKatL mit PSA keine deutliche quantitative Veränderung. Um trotz dieses assaytechnischen Problems eine Aussage über eine mögliche proteolytische Umsetzung von PKatL durch PSA zu erhalten, wurde folgendes Vorgehen geplant:

- ⇒ PKatL und PSA sollten gemeinsam vorinkubiert werden, um anschließend im Western Immunoblot eingesetzt zu werden,
- ⇒ sollten Verdaubanden entstehen, die für eine Proteolyse von PKatL durch PSA sprechen würden, so würde ein weiterer Immunoblot mit PKatL und HLE durchgeführt (proteolytische Aktivierung nachgewiesen) und die entstehenden Verdaubanden mit den (eventuell) PSA-generierten verglichen werden.

Allerdings muß hervorgehoben werden, daß bei diesem Vorgehen selbst im Falle positiver Befunde, kein sicherer Nachweis einer PSA-vermittelten Aktivierung von PKatL erbracht werden kann. Dies kann per se durch den alleinigen Nachweis einer Proteolyse nicht erbracht werden. Für den negativen Fall einer Nicht-Katalyse von PKatL wäre eine Aktivierung des Proenzym durch PSA aber mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen. Aus diesen Erwägungen schien das Vorgehen in Anbetracht der genannten assaytechnischen Schwierigkeiten gerechtfertigt, um wenigstens eine grobe Beschreibung der möglichen Interaktion der beiden Proteasen zu erhalten.

### **13.4 Western Immunoblots der Verdauansätze von PKatL mit HLE und PKatL mit PSA**

Wie zuvor beschrieben wurde zunächst der Western Immunoblot mit PKatL und PSA im Ansatz durchgeführt. Im Photo der Blotmembran sieht man in den Bahnen 1 und 2 wieder die auch zuvor verwendeten nieder- und hochmolekularen Proteingrößenmarker. Auf Bahn 3 wurde erneut der Rainbow molecular weight protein marker (Rmwm) eingesetzt. Auf Bahn 4 wurden 10 µl PSA mit 10 µl SDS-Probenpuffer (nach 1 Minute erhitzen auf 100 °C) aufgetragen, auf Bahn 5 10 µl PKatL nach pH-3,0-APu-Aktivierung (ebenfalls mit 10 µl SDS-Probenpuffer nach Kochen für 1 Minute). In den Bahnen 6 bis 9 finden sich jeweils die Vorinkubationsansätze aus je 5 µl PSA, 10 µl PKatL, 10 µl SDS-Probenpuffer und zur pH-Adjustierung auf den physiologischen Bereich 5 µl 0,5 m HEPES-Puffer pH 7,4. Die Ansätze wurden 4 h, 6 h, 8 h und 10 h bei 37 °C im Wasserbad vorinkubiert, bevor sie in die SDS-PAGE eingebracht

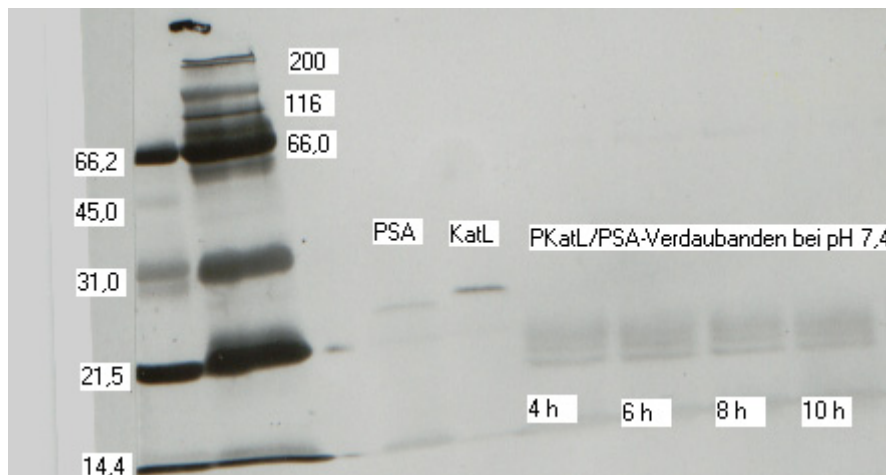
wurden. Nach erfolgter Gelelektrophorese erfolgte der Western Immunoblot wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben.

**Tabelle 13.9 Bahnenbelegung und Inkubationsbedingungen im Western Immunoblot von PKatL mit PSA, spezifischer und Kontrollblot**

	Bahn								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Inhalt	10 µl lmwm	10 µl hmwm	10 µl Rmwm	10 µl PSA	10 µl PKatL	je 5 µl PSA + 10 µl PKatL + 5 µl 0,5 m HEPES pH 7,4			
	jeweils + 10 µl SDS-Probenpuffer								
t (Vor)	Ø					4 h	6 h	8 h	10 h

t (Vor): Vorinkubationsdauer

**Photo 13.1 Western Immunoblot der Inkubation von PKatL mit PSA, spezifischer Blot**



Links im Bild erkennt man die Proteingrößenmarker. Der auf Bahn 3 aufgetragene Rmwm kam hier nicht zur Darstellung, was am ehesten auf einer zu kurzen Blottingzeit beruhte (die Proteine wurden nicht ausreichend auf die Membran übertragen). In der PSA-Bahn erkennt man 2 Banden bei etwa 21 und 25 kD. Hierbei handelte es sich am ehesten um PSA-Fragmente, die durch das für die Probenvorbereitung notwendige Erhitzen auf 100 °C im kochenden Wasserbad, also durch Denaturierung, entstanden sind. Auf Bahn 5 gut erkennbar die aktivierte KatL-Bande. Die folgenden Bahnen enthalten die PKatL/PSA-Gemische, hier zeigen sich insgesamt 3 dicht beieinander liegende Banden geringen Molekulargewichts (sicherlich deutlich < 20 kD pro Bande). Ein Unterschied in der quantitativen Ausprägung dieser Banden, die aus unterschiedlich langen Vorinkubationen entstanden, ließ sich nicht feststellen.

Im zugehörigen Kontrollblot ließen sich die in den Bahnen 6 bis 9 gefundenen Verdaubanden nicht darstellen, was dafür sprach, daß es sich um spezifische, also PKatL zugehörige Banden handelte. Zusammenfassend ließ sich also festhalten:

- ⇒ PSA ist in der Lage PKatL proteolytisch in kleinere Bestandteile zu spalten,
- ⇒ ob dies auch mit einer Aktivierung des Enzyms einhergeht, kann nicht geschlußfolgert werden, da diese Methode diesen Nachweis nicht zuläßt,
- ⇒ um bezüglich der Aktivierung durch PSA eine annähernde Aussage zu erhalten, wurde nun der gleiche Immunoblot nach Proteolyse von PKatL durch HLE durchgeführt, um die hierbei entstehenden Verdauubanden mit den PSA-generierten zu vergleichen.

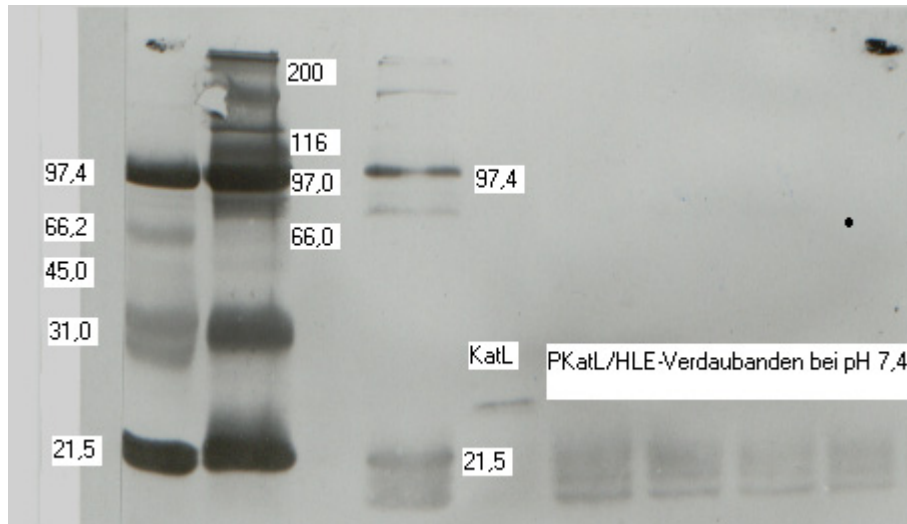
Der Western Immunoblot mit PKatL und HLE wurde analog den vorherigen Blots durchgeführt. Im Photo sieht man in den Bahnen 1 und 2 die nieder- und hochmolekularen Proteinmarker. Auf Bahn 4 wurde Rainbow molecular weight protein marker aufgetragen. Auf Bahn 5 finden sich 10 µl PKatL nach pH-3,0-APu-Aktivierung (mit 10 µl SDS-Probenpuffer). In den Bahnen 6 bis 9 finden sich die Vorinkubationsansätze aus je 5 µl HLE, 10 µl PKatL, 10 µl SDS-Probenpuffer und 5 µl 0,5 m HEPES-Puffer pH 7,4. Die Ansätze wurden wie zuvor 4 h, 6 h, 8 h und 10 h bei 37 °C im Wasserbad inkubiert und gelangten dann über die SDS-PAGE in den Immunoblot.

**Tabelle 13.10 Bahnenbelegung und Inkubationsbedingungen im Western Immunoblot von PKatL mit HLE, spezifischer und Kontrollblot**

	Bahn								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Inhalt	10 µl lmwm	10 µl hmwm	∅	10 µl Rmwm	10 µl PKatL	je 5 µl HLE + 10 µl PKatL + 5 µl 0,5 m HEPES pH 7,4 jeweils + 10 µl SDS-Probenpuffer			
t (Vor)	∅					4 h	6 h	8 h	10 h

t (Vor): Vorinkubationsdauer

**Photo 13.2 Western Immunoblot der Inkubation von PKatL mit HLE, spezifischer Blot**



Links im Bild finden sich die Proteingrößenmarker. Der auf Bahn 4 aufgetragene Rwmw kommt in diesem Blot besser zur Darstellung, da als Konsequenz auf die schlechte Übertragung auf die Blotmembran im PKatL/PSA-Immunoblot jetzt eine längere Blottingzeit gewählt worden war. Auf Bahn 5 findet sich die aktivierte KatL-Bande. Die Bahnen 6 bis 9 enthalten die PKatL/HLE-Gemische. Hier zeigen sich jeweils 3 dicht beieinander liegende Banden geringen Molekulargewichts. Die quantitative Ausprägung dieser Banden, die aus unterschiedlich langen Vorinkubationen entstanden, scheint sich nicht zu unterscheiden. Wie auch im vorherigen Blot zeigte die Kontrollmembran im Bereich der aufgetragenen Enzymgemische keine Banden, so daß es sich also auch hier um spezifische, d.h. KatL-Epitope enthaltende Banden handelte.

Im Vergleich der beiden Immunoblots aus Inkubationen von PKatL mit PSA sowie PKatL mit HLE ließ sich folgendes feststellen:

- ⇒ beide Verdauvorgänge generieren aus PKatL jeweils 3 dicht beieinander liegende Verdaubanden, deren Molekulargewichte deutlich unter 20 kD liegen,
- ⇒ rein optisch lassen sich auf den Blotmembranen keine eindeutig unterscheidenden Hinweise zwischen den PSA- und HLE-generierten Banden feststellen,
- ⇒ grundsätzlich kann also die Möglichkeit, daß es sich um sehr ähnliche Bruchstücke des Proenzym handelt aus den vorliegenden Befunden nicht ausgeschlossen werden,
- ⇒ dementsprechend kann auch die Möglichkeit einer PSA-proteolytisch vermittelten Aktivierung von PKatL zu KatL nicht sicher verworfen werden, aber diese These kann

durch die vorliegenden Befunde auch nicht bestätigt werden, da die Methode diesen qualitativen Aktivierungsnachweis nicht leisten kann.

## DISKUSSION

### 14 PROTEOLYTISCHE AKTIVIERUNG VON PKatL

#### 14.1 Übersicht über die Ergebnisse der HLE-abhängigen PKatL-Aktivierung

PKatL kann unter In-vitro-Bedingungen bei pH-Werten knapp unterhalb des physiologischen Bereichs (Optimum in den vorliegenden Versuchen um pH 7,0) durch HLE zum selbst proteolytisch aktiven KatL aktiviert werden. Diese Aktivierung erfolgt unter proteolytischer Umsetzung von PKatL durch HLE. Es konnte gezeigt werden, daß das von der Marburger NSCLC-Zelllinie EPLC 32 M1 unter PMA-vermittelter Stimulation stark exprimierte PKatL nach Inkubation mit HLE einen Größenshift im Western Immunoblot durchmacht, einhergehend mit diesem Shift ließ sich Aktivität im spezifischen KatL-Assay gegen das Testsubstrat Z-Phe-Arg-AMC nachweisen (Erstbeschreibung des Assay durch Barrett/Kirschke 1981). Das HLE-abhängig erreichte Aktivierungsniveau der Zysteinprotease KatL liegt um etwa den Faktor 100 niedriger als bei der sogenannten sauren Aktivierung (die als pH-abhängige Standardmethode gilt), wie sie für einen pH von 3,0 beschrieben ist (Gal/Gottesman 1986, Maciewicz et al. 1988 und 1990).

Im ausgetesteten pH-Bereich von 6,0 bis 7,5 scheint bei insgesamt eher diskreten Differenzen der absoluten Aktivierungshöhe (gemessen als dimensionsloser Zahlenwert der fluoreszenzspektrometrischen Messung) ein pH von 7,0 (also knapp unter dem physiologisch-interstitiellen pH) die besten Ergebnisse zu liefern. Die geringe Abweichung in den sauren Bereich scheint sogar gut nachvollziehbar, da in soliden Tumoren (deren Blutversorgung von peripher nach zentral häufig deutlich schlechter wird) meist eine eher hypoxämische Versorgungslage vorherrscht. Zusammen mit der dadurch noch verstärkt vorhandenen entzündlichen Infiltration der Geschwulst durch Immunzellen des Organismus ist ein intratumoröser pH-Wert unterhalb des Normalmilieus also durchaus nichts Ungewöhnliches. Die soeben genannten Punkte Blutversorgung des Tumors und vor allem entzündliche Infiltration durch Immunzellen (vor allem neutrophile Granulozyten und Monozyten) liefern nachvollziehbare Gründe für die Verwendung von HLE zur Aktivierung der Tumorprotease PKatL. Grundsätzlich handelt es sich hier um eine ubiquitär vorhandene Serinprotease, die zudem als Granulozytenprodukt besonders in Entzündungsgebieten (mit dementsprechend eher leicht azidotischem pH) gehäuft anzutreffen ist. Bei HLE handelt es sich somit um eine in malignen Geweben zu findende, vom Immunsystem exprimierte Protease.

#### 14.1.1 Würdigung und Kritik der Vorarbeiten - Konsequenzen für die vorliegende Arbeit

Vergleicht man die Ergebnisse der vorliegenden HLE-Aktivierungsversuche mit den grundlegenden Arbeiten zur proteolytischen Aktivierung von Proenzymen der Kathepsinfamilie, so finden sich eine Reihe grundsätzlicher Übereinstimmungen. Gleichzeitig finden sich aber vom aktuellen Standpunkt der Forschung durchaus auch gewichtige Kritikpunkte an den im folgenden dargestellten Vorarbeiten. In der vorliegenden Arbeit wurde daher Wert auf die Vermeidung dieser potentiellen Unsicherheitsfaktoren gelegt. Diese sollen aus der folgenden Besprechung der Vorarbeiten abgeleitet werden

Wiederanders und Kirschke (1989, Kirschke et al. beschrieben 1977 erstmals das Kathepsin L als neu entdecktes Mitglied der Papainfamilie der Kathepsine) inkubierten PKatL-haltiges konditioniertes Medium (von kultivierten Rattenfibroblasten) mit aufgereinigtem Kathepsin D (KatD). Sie stellten im Immunoblot einen Größenshift des PKatL von 39 kD auf 32 kD fest. Begleitend zeigte sich eine Aktivierung zu KatL und im spezifischen KatL-Assay eine Generierung typischer Fluoreszenzaktivität gegen das synthetische Substrat Z-Phe-Arg-NHMec, so daß auf eine proteolysevermittelte Aktivierung des Zielenzyms geschlossen wurde. Als aktivierendes Agens sahen die Autoren das ins Medium eingebrachte aktive KatD. Da sich aktives KatD auf der luminalen Seite des Golgi-Apparats findet, in dem die entscheidenden Schritte der Maturation von Preprokathepsinen zu sezernierbaren Prokathepsinen stattfinden, schlossen sie auf eine mögliche Relevanz ihrer Ergebnisse für die Verhältnisse in vivo.

In einem ähnlichen Experiment zeigten Burnett et al. (1995) an Prokathepsin B (PKatB) eine elastasevermittelte Aktivierung zu aktivem Kathepsin B (KatB). Hierzu wurde PKatL-haltiges konditioniertes Medium (aus Kulturen menschlicher Bronchialepithelzellen) mit HLE inkubiert. Auch hier zeigte sich im Western Immunoblot ein Größenshift des PKatB von initial 42 kD zu einer Form mit 38 kD, wiederum analog begleitet durch eine Aktivierung mit Nachweis enzymatischer Umsetzung des synthetischen Substrats Z-Arg-Arg-NHMec. Die Autoren schlossen auf eine hauptsächliche Stimulation der Aktivität von KatB in menschlichem Bronchialsekret durch Proteinase. Hierbei bezogen sie sich auf das aus anderen pathophysiologische Prozessen der Lunge (z.B. Emphysementstehung der Raucherlunge) bekannte Imbalancemodell zwischen proteolytischen und antiproteolytischen Enzymen. Als inhibitorische Gegenspieler der Zysteinproteasen, die durch Bindung des aktiven Kathepsins dessen aktives Zentrum blockieren, sind z.B. die Cystatine A-D seit längerem bekannt (vgl. Freije et al. 1993).

Die genannten Arbeiten von Wiederanders/Kirschke und Burnett et al. zur Aktivierung von Prokathepsinen weisen also einheitlich auf einen proteolysevermittelten Prozeß hin, in dem z.B. andere Kathepsine oder aber auch im Leukozyten-infiltrierten, entzündlichen Milieu vorkommende neutrophile Enzyme wie HLE eine zentrale Rolle spielen. Sie haben daher als grundlegende Arbeiten richtungsweisenden Charakter für die Fragestellung dieser Arbeit.



Trotzdem bieten sie methodisch und des weiteren unter Berücksichtigung neuerer Veröffentlichungen zur Physiologie und Biochemie der Kathepsine auch eine Reihe von inhaltlichen Punkten, die kritisch diskutiert werden müssen (und deren Vermeidung in der vorliegenden Arbeit wichtig war). Zunächst wird als Ausgangsmaterial des experimentellen Vorgehens in beiden Fällen nicht bzw. rudimentär aufgereinigtes Kulturmedium zur Versuchsdurchführung verwendet. Dieses Vorgehen schließt die Einflüsse einer Vielzahl von Inhibitoren und Enzymen experimentell nicht aus (was meiner Meinung nach bei In-vitro-Versuchen gewährleistet sein sollte) und ihr Beitrag zu den dargestellten Resultaten bleibt daher unklar. Der direkte Rückschluß auf eine Aktivierung von PKatL durch die zugefügten Enzyme (also KatD bzw. HLE) ist somit meiner Meinung nach nur sehr eingeschränkt möglich, Interpretationen können daher nur spekulativ bleiben – sicher abgeleitete Rückschlüsse erscheinen kaum möglich. Wie im Gerinnungssystem (oder bei anderen plasmatischen Proteinsystemen, z.B. Fibrinolyse oder Komplementsystem) ist durchaus auch eine proteolytische Aktivierungskaskade vorstellbar, an dessen Anfang oder in deren Verlauf KatD oder HLE durchaus eine Rolle spielen könnten. In diesem Fall würden die untersuchten Enzyme aber wahrscheinlich keine zentrale Rolle spielen (oder zumindest nicht alleine), sondern wären Teil eines weitaus komplexeren Ablaufs. Allerdings darf nicht außer acht gelassen werden, daß Wiederanders/Kirschke und Burnett et al. als Erste Arbeiten zum Thema vorlegten, in deren Rahmen nur (bei fehlenden Vorarbeiten) grobe Orientierungen möglich waren. Die von den Autoren in Anbetracht der methodischen Unzulänglichkeiten gezogenen Schlüsse gehen nach meiner Meinung aber über das zulässige Maß hinaus.

Ein weiteres methodisches Problem stellt die von Wiederanders/Kirschke durchgeführte Inkubation des konditionierten, PKatL-enthaltenden Mediums im pH-Bereich zwischen 3,5 und 5,0 dar. In diesem Bereich spielt zum einen die pH-vermittelte autokatalytische Aktivierung von PKatL („saure Aktivierung“) eine übergeordnete Rolle. Zum anderen sind pH-vermittelte Aktivierungen möglicherweise zusätzlich im Medium enthaltener Kathepsine (u.a. Zysteinproteasen) und deren Einflüsse auf PKatL experimentell nicht kontrolliert (womit wieder das Problemfeld der ungenügenden Aufreinigung des Untersuchungsmaterials eröffnet wird). Da aber die saure Aktivierung ein bei Zysteinproteasen unterschiedlichster Herkunft grundsätzlich nachgewiesener In-vitro-Mechanismus ist (Übersicht bei Chapman et al. 1997), muß die eigentliche Proteolyseabhängigkeit der Aktivität in Frage gestellt werden. Burnett et al. inkubierten dagegen im alkalischen Bereich (pH 8,6) des pH-Optimums von HLE und waren somit einerseits weit vom autokatalytischen pH-Bereich, andererseits aber auch von den physiologischen Bedingungen des Interstitiums entfernt. Zusammenfassend können die Grundaussagen also nur eingeschränkt gewichtet werden, zumal die dargestellten methodischen Probleme in den Diskussionen der Autoren keine Berücksichtigung finden.

Zur Vermeidung dieser Kritikpunkte wurde in der vorliegenden Arbeit hochgereinigtes (und als frei von Verunreinigungen durch andere Proteine anzusehende) PKatL aus NSCLC-Zelllinien bei pH-Werten im Bereich des physiologischen Milieus mit HLE bzw. PSA inkubiert. Durch den aufwendigen Gewinnungsprozeß und die anschließende Verwendung einer sehr reinen Probe konnte der eventuell verfälschende (oder zumindest experimentell nicht kontrollierte) Einfluß verschiedenster Inhibitoren und Enzyme weitestgehend ausgeschlossen werden. Dies wurde speziell für den potentesten, von NSCLC-Zellen exprimierten Suppressor katheptischer Aktivität, das SCCA, dokumentiert. Hierdurch konnte von vorneherein sichergestellt werden, daß eventuell zu beobachtende Effekte durch Inkubation mit HLE oder PSA nur auf diese zurückzuführen wären. Interaktionen zwischen verschiedenen Enzymen im Aktivierungsprozeß oder gar die gleichzeitige Untersuchung kaskadenartiger Proteolyseabläufe erscheinen zu komplex, um sie mit der Zielsetzung einer abgesicherten Aussage sinnvoll durchführen zu können. Um die theoretische Übertragbarkeit der Ergebnisse auf In-vivo-Konditionen a priori zu verbessern, wurden die Aktivierungsversuche im Bereich des physiologischen pH-Werts (bzw. knapp darunter) durchgeführt. Somit konnten durch sauren pH verursachte autokatalytische Aktivierungseffekte kontrolliert werden und (zumindest) in Bezug auf den pH-Wert nahezu physiologische Bedingungen erstellt werden.

#### **14.1.2 Methodische Probleme beim Nachweis einer PSA-vermittelten PKatL-Aktivierung**

Die Aktivierung von PKatL durch die kallikrein-artige Serinprotease PSA konnte in der vorliegenden Arbeit aus methodischen Gründen nicht nachgewiesen werden. PSA, das im Gegensatz zu den oft ubiquitär vorkommenden Tumorproteasen (wie KatB, KatD, Matrix-Metalloproteinasen u.a.) in nennenswertem Umfang nur von Prostatagewebe produziert wird, interagiert mit dem für diese Arbeit verwendeten spezifischen Assay zum Nachweis von aktivem KatL. Da PSA das synthetische KatL-Substrat Z-Phe-Arg-AMC selbst umsetzt, kann eine KatL-abhängige Aktivierung nicht mehr sicher nachgewiesen werden. Das durch diesen direkt PSA-abhängigen Effekt gemessene fluoreszenzspektrometrische Aktivierungsniveau lag hierbei in etwa im gleichen Größenbereich wie bei HLE-abhängiger PKatL-Aktivierung. Aus diesem Grund konnten auch keine Näherungen an den tatsächlichen Meßwert bestimmt werden, bei denen man von einem hypothetisch zu messenden höheren Aktivierungsniveau den verfälschenden, direkt PSA-abhängigen Anteil hätte subtrahieren müssen.

Um wenigstens eine Aussage über grundsätzliche Interaktionen zwischen inaktivem PKatL und PSA zu erhalten wurden die im Ergebnisteil dargestellten Inkubationsversuche mit anschließendem Western Immunoblot des Inkubationsgemisch durchgeführt. Die Ergebnisse wurden mit in analoger Weise durchgeführten Immunoblots von PKatL/HLE-Ansätzen verglichen. Auf diese Weise konnte nachgewiesen werden, daß PSA (ähnlich wie das sicher aktivierende HLE) PKatL proteolytisch umsetzt. Eine grundsätzliche Interaktion dieser beiden

Enzyme läßt sich also bei pH-Werten unterhalb des physiologischen Bereichs unter In-vitro-Bedingungen nachweisen. Ob diese Proteolyse des PKatL durch PSA aber auch zur Entstehung spezifisch-proteolytischer Aktivität der Zysteinprotease führt, kann hierdurch keinesfalls abgeleitet werden. Der Western Immunoblot macht also nur eine beschreibende Aussage über das Produkt der Enzyminteraktion – der qualitative Nachweis einer spezifischen Aktivität ist mit dieser Vorgehensweise aus methodischen Gründen nicht zu führen.

Eine Möglichkeit der Bestätigung oder Ablehnung der Aktivierungshypothese wäre qualitativ und methodisch am saubersten durch einen spezifischen KatL-Assay zu führen, dessen Substrat (anders als das hier verwendete Z-Phe-Arg-NHMec) sicher nicht mit PSA interagiert. Zwar existieren neben dem üblicherweise angewandten Assay nach Barrett/Kirschke durchaus noch alternative Fluoreszenzsubstrate, doch basieren diese Peptide durchgängig auf der Grundformel Z-Phe-Arg- bzw. Z-Arg-Arg-Rest. Es ist also vorstellbar, daß auch diese anderen Substrate mit PSA interagieren. Zur qualitativen Charakterisierung der PSA-abhängigen PKatL-Proteolyse müßten also die verschiedene noch am Markt befindlichen Peptidsubstrate durchgetestet werden.

#### **14.2 Denkmodelle zur extrazellulär-proteolytischen PKatL-Aktivierung**

Nach Darstellung und Diskussion der experimentellen Ergebnisse in bezug auf die grundlegenden Vorarbeiten möchte ich unter Berücksichtigung weiterer Arbeiten aus dem Feld der proteolytischen Proenzymaktivierung Denkmodelle entwickeln. Diese Modelle stellen meine theoretischen Vorstellungen zum eventuellen Ablauf des Aktivierungsprozesses in vivo dar. Hierbei beziehe ich mich aber speziell auch auf die in der Einleitung dargestellten Theorien zum Mechanismus der extrazellulären PKatL-Aktivierung im Rahmen einer NSCLC-Erkrankung, die in diesem Feld aktuell diskutiert werden:

- ⇒ proteolytische Aktivierung durch andere Proteasen,
- ⇒ pH-abhängige Aktivierung im sauren Milieu,
- ⇒ proteolytische Aktivierung durch aktives KatL.

Trotz der methodisch orientierten Kritik an den Vorarbeiten von Wiederanders/Kirschke und Burnett et al. läßt sich die Grundaussage einer proteolysevermittelten Aktivierung von Prokathepsinen durch Arbeiten von Nishimura et al. (1987 und 1989) stützen. Diese Autoren verwendeten einen sehr potenten Inhibitor speziell von Aspartatproteinasen wie dem KatD, das Pepstatin (Übersicht bei Tumminello 1993), in kultivierten Rattenhepatocyten. Die Menge an gebildetem aktivem KatL (aber auch anderer Proteasen wie KatH und KatB) ging daraufhin deutlich zurück, was nicht auf verminderte Proteinbiosynthese, sondern auf Hemmung der Maturation im Bereich des Golgi-Apparats und der Lysosomen zurückgeführt wurde. Die inhibierte Aspartatproteinasen konnte zwar nicht identifiziert werden, aber die Vermutung, daß es sich um das im Golgi-Apparat hochaktive KatD handelt, liegt nahe. Die proteolytische

Aktivierung von Prokathepsinen durch Einwirkung anderer Enzyme erscheint ein naheliegender Erklärungsansatz für die Fragestellung dieser Arbeit zu sein. Unter den In-vitro-Bedingungen des Labors konnte der Mechanismus für HLE-inkubiertes PKatL aus der NSCLC-Linie EPLC 32 M 1 nachgewiesen werden. Der Nachweis einer proteolytischen Aktivität von PSA auf PKatL gelang aus methodischen Gründen nicht, erscheint aber nicht ausgeschlossen.

Ein auffallender Punkt bleibt die unter den Laborbedingungen nicht stark ausgeprägte Aktivierung durch HLE, da die Aktivität von KatL in vivo ein sehr hohes Niveau erreicht (Barrett/Kirschke 1981). Dieses hohe Niveau wird in vitro nur durch pH-abhängige Aktivierungsmechanismen („saure Aktivierung“ bei pH 3,0) erreicht, so daß dieser Aktivierungsweg, der inzwischen als verstanden gilt, ebenfalls diskutiert werden sollte.

Die pH-abhängige Aktivierung von Proformen der Zysteinproteasen bei pH-Werten um 3,0 ist in den Neunziger Jahren Gegenstand mehrerer Veröffentlichungen gewesen, die maßgeblich zum Verständnis des Mechanismus beigetragen haben. Die Grundlage der pH-abhängigen Aktivierungstheorie stellt die inzwischen geklärte Rolle der Proregion in der Aminosäuresequenz von Zysteinproteasen dar. Coulombe et al. stellten 1996 dar, daß die dreidimensionale Struktur des Prosegments eine Substratbindung im Bereich des aktiven Zentrums verhindert: der globuläre N-terminale Abschnitt des Prosegments (bestehend aus drei  $\alpha$ -Helices mit einem hydrophoben Kern) stellt über aromatische Seitenketten ausgedehnten Kontakt zum eigentlichen Kathepsin L her. Hierdurch wird dem C-terminalen Abschnitt des Prosegments der Kontakt zur Substratbindungsstelle des Enzyms ermöglicht. Diese wird sterisch gegen Substrate abgeschirmt und das Enzym somit inaktiv gehalten. Auf diese Weise bleibt die PKatL-exprimierende Zelle von der starken proteolytischen Aktivität des Enzyms während dessen intralysosomaler Maturation verschont – eine intrazelluläre Aktivierung des sehr aktiven lysosomalen Enzyms hätte sicherlich starke nachteilige Effekte für die exprimierende Zelle. Dieser Effekt konnte bestätigt werden, als Carmona et al. 1996 zeigten, daß freie Prosegmente in der Lage sind, schon aktive Enzyme erneut zu hemmen. Des weiteren wird die korrekte Quartärstruktur des PKatL, sowie dessen ausgeprägte Resistenz gegenüber alkalischem pH durch das Prosegment bedingt (Tao et al. 1994). Richo und Conner wiesen die pH-abhängige Aktivierung in vitro 1994 für PKatD nach, 1996 konnten Bossard et al. die Säureaktivierung für ProkathepsinK (PKatK), das sich fast ausschließlich im Knochen findet, zeigen (in ähnlicher Weise 1999 von McQueney et al. dargestellt). Wie schon erwähnt verfügen die Osteoklasten der Bone-remodelling-Units (BRUs) des Knochens über die Fähigkeit ,durch Ansammlung schwacher Säuren in Osteoidporen ein saures Mikroklima zu erzeugen, in dem pH-abhängige Aktivierungen von Proenzymen möglich sind. Diese bei benignen Zellen seltene Fähigkeit ist bisher für maligne Zellen (außer bei seltenen Knochentumoren) nicht nachgewiesen.

Jerala et al. wiesen 1998 nach, daß die Proregion im sauren Milieu einem fast kompletten Verlust an Tertiärstruktur unterliegt, der schließlich ab pH-Werten um 4,0 zur sogenannten geschmolzen-globulären Struktur („molten globule“) führt. In dieser Konfiguration liegt die Proregion nur noch in der Sekundärstruktur der Aminosäuresequenz vor und kann das aktive Zentrum des Enzyms nicht mehr gegen Substratbindung abschirmen. Diese Änderung der dreidimensionalen Proteinstruktur der Protease führt zur Aktivierung mit konsekutivem Verlust der Proregion. Dieser in vitro gut belegte Aktivierungsmechanismus erscheint aber aufgrund der pH-Abhängigkeit nur schwerlich auf die Verhältnisse in vivo übertragbar. Die Kluft zwischen gut belegter Theorie in vitro und fehlender Übertragbarkeit in vivo könnte aber verkleinert werden: für verschiedene anionische Oligosaccharide der extrazellulären Matrix konnte nachgewiesen werden, daß sie z.B. bei Matrix-Metallo-Proteinasen (MMPs, eine weitere Familie der Endopeptidasen) die Erzeugung der geschmolzen-globulären Konformation und damit die Autoaktivierung in pH-Bereiche deutlich höher als 3,0 (etwa um 5,0) verlagern können (Davis/Martin 1990). Diese Eigenschaft konnte auch für anionische Oberflächen zellulärer Phospholipidmembranen nachgewiesen werden (Banuelos/Muga 1995, van der Goot et al. 1991). Der genaue Mechanismus dieser Effekte ist allerdings noch nicht verstanden, am ehesten spielen interaktionsabhängige Änderungen der sterischen Konformation der Enzyme eine Rolle.

Als Ausblick und Spekulation erscheint eine Synthese der verschiedenen Vorstellungen zur extrazellulären Aktivierung von Prokathepsinen sehr attraktiv. Konformationsänderungen der Proenzyme führen zu erleichterter Autoaktivierung, Einflüsse der extrazellulären Matrix und zellulärer Membranoberflächen ermöglichen diesen Effekt auch bei nur schwach sauren pH-Werten (wie sie durchaus in entzündlich infiltrierten Tumoren vorkommen können) und schließlich ermöglichen ubiquitär vorhandene Enzyme des Interstitiums (wie z.B. HLE) eine Proteolyse der Proregion. Sicherlich handelt es sich hier zunächst um eine stark konstruierte Spekulation zu einem sehr komplexen Ablauf, aber ich halte dieses Modell für bedenkenswert, da es die offensichtlichen Schwächen der einzelnen Theorien in der Übertragbarkeit auf die Verhältnisse in vivo berücksichtigt.

Einen meiner Meinung nach noch interessanteren Ansatz läßt sich aus den vorliegenden Ergebnissen zur HLE-abhängigen PKatL-Aktivierung in Verbindung mit aktuellen Ergebnissen zur autokatalytischen PKatL-Aktivierung entwickeln. Ménard et al. konnten 1998 diese autokatalytische Aktivierung von rekombinantem PKatL durch geringe Mengen an aktivem KatL nachweisen. Sie exprimierten rekombinantes PKatL in *Pichia pastoris* und inkubierten dieses (nach suffizienter) Aufreinigung mit aktivem KatL bei einem pH von 5,1. Sie konnten zeigen, daß inaktives PKatL in vitro durch geringe Mengen an aktivem KatL aktiviert werden konnte, was sie als Autokatalyse bezeichneten. Diese Ergebnisse widersprachen scheinbar zunächst Veröffentlichungen von Nomura/Fujisawa (1996 und 1997), die in einem fast

identischen Experiment keine Interaktionen zwischen PKatL und KatL bei pH 4,0 feststellen konnten und die Hypothese einer Autokatalyse durch aktives Enzym nicht favorisierten. Dieser Einwand wird aber durch eine aktuelle Veröffentlichung von Turk et al. (1999) entkräftet, die nachweisen konnten, daß aktives KatL (aber nicht inaktives PKatL) im sauren Milieu und speziell ab pH 4,0 einen zunehmenden Funktionsverlust erleidet. Interessanterweise konnten Ménard et al. auch zeigen, daß die KatL-abhängige PKatL-Aktivierung bei pH 5,1 zwar nicht das Aktivierungsniveau der In-vitro-Referenzmethode („saure Aktivierung“ bei pH 3,0), aber doch einen quantitativ bedenkenswerten Umfang erreicht. Im Licht dieser Informationen scheint die quantitativ nur auf niedrigem Niveau stattfindende In-vitro-Aktivierung von PKatL durch HLE, wie sie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, als attraktives Denkmodell: es wäre ein vorstellbar, daß eine PKatL-Aktivierung durch HLE bei fast physiologischem pH geringe Mengen an KatL generiert, die ihrerseits im schwach sauren Milieu größere Mengen PKatL aktivieren können. In diesem Denkmodell fällt also der quantitativ geringe Ausprägungsgrad der HLE-induzierten Aktivierung nicht mehr kritisch ins Gewicht. Die Protease HLE würde in einer solchen Aktivierungskaskade also nur als Anstoßgeber fungieren, der die quantitativ wesentlich ausgeprägtere Autoaktivierung von PKatL durch KatL einleitet.

## ZUSAMMENFASSUNG

Kathepsin L (KatL) ist eine Endopeptidase aus der Familie der Zysteinproteinasen. Physiologischerweise finden sich diese Enzyme in den intrazellulären Vakuolen bei Pflanzen und im lysosomalen Kompartiment von Mensch und Tier. Das hochaktive KatL ist im menschlichen Organismus ubiquitär vorhanden und bewältigt im Zusammenspiel mit anderen lysosomalen Enzymen (darunter viele weitere Kathepsine) einen großen Teil des Proteinturnover. Eine Vielzahl von Proteinen stellen Substrate dieser Protease dar, so z.B. die intrazellulären Funktionsproteine Aktin, Myosin und die Histone des Nukleus, sowie die extrazellulären Polypeptide Insulin, Glukagon und hochmolekulare Eiweißbestandteile der Extrazellulärmatrix (z.B. Typ-I- und Typ-IV-Kollagen, Laminin und verschiedenste Proteoglykane). Insbesondere die proteolytische Spaltung dieser wichtigen Bestandteile der Basalmembran begründen den prometastatischen Effekt von KatL im Rahmen maligner Erkrankungen. Das Enzym wird als inaktive Proform Prokathepsin L (PKatL) von vielen neoplastischen Tumoren sezerniert und insbesondere für Nicht-Kleinzellige-Bronchialkarzinome (NSCLC) konnte diese Expression in vergleichsweise starker Ausprägung nachgewiesen werden. In Tumormodellen, in denen die Fähigkeit zur Prokathepsin-L-Bildung experimentell gehemmt wird, verlieren diese Zellen ihre Metastasierungsfähigkeit bzw. erfahren eine quantitativ starke Hemmung derselben. Aus diesem Grund gilt KatL als eines der Schlüsselenzyme für die Degradation extrazellulärer Matrix durch NSCLC und konsekutiv für deren metastatische Absiedlung. Die Bildung von Tochtergeschwülsten geht bei Bronchialkarzinomen zudem mit einer eklatanten Verschlechterung von Prognose und Therapiemöglichkeiten einher.

Die in Marburg in der Abteilung für Hämatologie und Onkologie seit vielen Jahren kultivierten NSCLC-Zelllinien exprimieren das Enzym ausschließlich in seiner inaktiven Proform, wobei die Art und Weise der extrazellulären Aktivierung nicht geklärt ist. Ein besseres Verständnis dieses Aktivierungsmechanismus könnte langfristig neue Therapieansätze mit dem Ziel der Hemmung von Tumorproteasen bieten. Aktuell werden die proteolytische Aktivierung durch andere Proteasen, sowie pH-abhängige Mechanismen, die über Veränderungen der Konformation des Proteins eine Aktivierung ermöglichen, diskutiert.

Zur Frage der möglichen Aktivierung von Prokathepsin L durch ubiquitär in Plasma und Interstitium vorkommende Serinproteasen wurde die vorliegende Arbeit durchgeführt. Per expansiver Zellkultur wurden aus der in Marburg etablierten NSCLC-Linie EPLC 32 M 1 große Mengen an konditioniertem Medium unter stimulatorischen Wachstumsbedingungen gewonnen. In einem mehrschrittigen Aufreinigungsprozeß mit Affinitätschromatographie, proteingrößen-

und proteinladungsbezogener Gelchromatographie, Zwischenschritten mit Dialyse und Membranfiltration wurde eine hochaufgeereinigte PKatL-Probe gewonnen. In Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und davon abgeleiteten Western Immunoblots mit spezifischen Antikörpern gegen KatL konnte die Reinheit der Probe dokumentiert werden. Unter Verwendung dieser Probe wurden im spezifischen PKatL-Assay Aktivierungsversuche durchgeführt, wobei der Frage nach einer möglichen enzymvermittelten Aktivierung von PKatL durch limitierte Proteolyse nachgegangen wurde. Nach verschiedenen Vorversuchen zur Optimierung von Inkubationsdauer und Probenvolumen wurde PKatL zunächst mit Humaner Leukozytenelastase (HLE) unter Variation der Assaybedingungen inkubiert. Die Serinprotease HLE ist ein ebenfalls ubiquitär in Granulozyten vorkommendes hochaktives Enzym, das insbesondere im leicht sauren Milieu entzündlich infiltrierter Tumoren zu finden ist. Auf quantitativ niedrigem Niveau konnte der Nachweis einer HLE-vermittelten Aktivierung von PKatL zu KatL im spezifischen Assay und im Western Immunoblot erbracht werden. Die Aktivierung konnte (im Gegensatz zu pH-abhängigen Aktivierungswegen im deutlich sauren pH-Bereich hier bei nahezu physiologischem pH von 7,0 gezeigt werden). Analoge Aktivierungsversuche mit der kallikreinartigen Serinprotease Prostata-Spezifisches-Antigen (PSA) konnten aufgrund methodischer Probleme (Interaktion von PSA mit dem spezifischen KatL-Substrat Z-Phe-Arg-AMC im Assay) nicht zweifelsfrei nachgewiesen werden.

Unter Berücksichtigung aktueller Veröffentlichungen zur enzymvermittelten Aktivierung von Proformen verschiedener Kathepsinproteasen lassen sich nun mehrere Denkmodelle erstellen, wie die extrazelluläre Aktivierung in vivo aussehen könnte. In einer hierfür entscheidenden Arbeit zum Thema war die quantitativ bedeutsame autokatalytische Aktivierung von PKatL durch aktives KatL bei nur leicht sauren pH-Werten nachgewiesen worden, allerdings fehlte in diesem Modell bislang der Nachweis einer initialen Aktivierung, durch die die kaskadenartige Autoaktivierung angestoßen wird. Mit dem Nachweis der HLE-vermittelten PKatL-Aktivierung bei pH 7,0 könnte der initiale Schritt dieser Aktivierungskaskade in entzündlich infiltrierten Tumorgewebe erklärt werden.

Auf diesen Ergebnissen aufbauend könnten Fragestellungen zukünftiger Versuche möglicherweise stabilisierende und verstärkende Einflüsse dieser Initiierung durch Moleküle der Extrazellulärmatrix oder polyanionische Zelloberflächen (wie sie für andere enzymvermittelte Aktivierungen interstitieller Enzyme beschrieben sind) näher charakterisieren. Langfristig wäre vor allem die Frage nach spezifischen Hemmstoffen von Tumorproteasen von großem Interesse. Diese hypothetische Therapieoption könnte dann zielgenau im prognoseentscheidenden Schritt einer malignen Erkrankung, der Absiedlung metastatischer Tochtergeschwülste, eingreifen.



## Literaturverzeichnis

Auerbach R, Patterns of tumor metastasis: organ selectivity in the spread of cancer cells. *Lab Invest* 1988, 58; 361-364

Aznavorian S, Murphy AN, Stetler-Stevenson WG, Liotta LA, Molecular aspects of tumor cell invasion and metastasis. *Cancer* 1992, 71(4); 1368-1383

Bailey A, The epidemiology of bronchial carcinoma. In: Bates M, *Bronchial Carcinoma. An integrated approach to diagnosis and management*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1984; S.11-22

Banks-Schlegel SP, Gazdar AF, Harris CC, Intermediate filament and cross-linked envelope expression in human lung tumor cell lines. *Cancer Res* 1985, 45(3); 1187-1197

Banuelos S, Muga A, Binding of molten globule-like conformations to lipid bilayers. *J Biol Chem* 1995, 270(50); 29910-29915

Baricos WH, Zhou Y, Mason RW, Barrett AJ, Human kidney cathepsins B and L. Characterization and potential role in degradation of glomerular basement membranes. *Biochem J* 1988, 252, 301-304

Baron R, Neff L, Louvard D, Courtot PJ, Cell-mediated extracellular acidification and bone resorption: evidence for a low pH in resorbing lacunae and localization of a 100-kD-lysosomal membrane protein at the Osteoclast ruffled border. *J Cell Biol* 1985, 101; 2210-2222

Barrett AJ, Kirschke H, Cathepsin B, Cathepsin H, and Cathepsin L. *Methods In Enzymologie* 1981, 80; 535-561

Barrett AJ, Rawlings ND, Proteinases. Types and families of endopeptidases. *Biochem Soc Trans* 1991, 19; 707-715

Barsky SH, Rao CN, Williams JE, Liotta LA, Domains of laminin which alter metastases in a murine model. *J Clin Invest* 1984, 74; 843-848

Becker N, Wahrendorf J, Krebsatlas der Bundesrepublik Deutschland 1981-1990. Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg. Berlin, Heidelberg, New York 1998. 3., völlig neu bearbeitete Auflage; S. 306ff

Bepler G, Jaques G, Neumann K, Aumüller G, Gropp C, Havemann K, Establishment, growth properties and morphological characteristics of permanent human small cell lung cancer cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol* 1987, 113(1); 31-40

Bepler G, Köhler A, Kiefer P, Havemann K, Beisenherz K, Jaques G, Gropp C, Haeder M, Characterization of the state of differentiation of six newly established human non-small-cell lung cancer cell lines. *Differentiation* 1988, 37(2); 158-171

Bergh J, Nilsson K, Dahl D, Andersson L, Virtanen I, Lehto VP, Expression of intermediate filaments in established human lung cancer cell lines. An indicator of differentiation and derivation. *Lab Invest* 1984, 51(3); 307-316

Bergh J, Nilsson K, Ekman R, Giovanella B, Establishment and characterization of cell lines from human small cell and large cell carcinomas of the lung. *Acta Pathol Microbiol Immunol Scand* 1985, 93(3); 143-147

Berridge MJ, Inositol trisphosphate and diacylglycerol: two interacting second messengers. *Annu Rev Biochem* 1987, 56; 159-193

Blot WJ, The epidemiology of cancer. In: Wyngaarden JB, Smith LH, Bennet JC, Cecil Textbook of Medicine. WB Saunders, Philadelphia, London; pt 1, pp. 1027-1029

Boike G, Lah T, Sloane BF, Rozhin J, Honn K, Guirguis R, Stracke ML, Liotta LA, A possible role for cysteine proteinase and its inhibitors in motility of malignant melanoma and other tumor cells. *Melanoma Res* 1992, 1(5-6); 333-340

Bossard MJ, Tomaszek TA, Thompson SK, Amegadzie BY, Hanning CR, Jones C, Kurdyla JT, McNulty DE, Drake FH, Gowen M, Levy MA, Proteolytic activity of human osteoclast Cathepsin K. *J Biol Chem* 1996, 271(21), 12517-12524

Brenner H, Ziegler H, Monitoring and projecting cancer incidence in Saarland, Germany, based on age-cohort analyses. *J Epidemiol Community Health* 1992; 46, 15-20

Brower M, Carney DN, Oie HK, Gazdar AF, Minna JD, Growth of cell lines and clinical specimens of human non-small cell lung cancer in a serum-free defined medium. *Cancer Res* 1986, 46(2); 798-806

Bühling F, Gerber A, Ansorge S, Welte T, Katheptische Zysteinproteasen in der Lunge. *Pneumologie* 1999, 53; 400-407

Burnett D, Abrahamson M, Devalia JL, Sapsford RJ, Davies RJ, Buttle DJ, Synthesis and secretion of Procathepsin B and Cystatin C by human bronchial epithelial cells in vitro: modulation of Cathepsin B activity by Neutrophil Elastase. *Arch Biochem Biophys* 1995, 317(1); 305-310

Carmelli D, Swan GE, Robinette D, Fabsitz R, Genetic influence on smoking – A study of male twins. *N Engl J Med* 1992, 327(12); 829-833

Carmona E, Dufour E, Plouffe C, Takebe S, Mason P, Mort JS, Ménard R, Potency and selectivity of the cathepsin L propeptide as an inhibitor of cysteine proteases. *Biochemistry* 1996, 35; 8149-8157

Carney DN, Gazdar AF, Minna JD, Positive correlation between histological tumor involvement and generation of tumor cell colonies in agarose in specimen taken directly from patients with small cell carcinoma of the lung.. *Cancer Res* 1980, 40(6); 1820-1823

Carr DT, Lung cancer: from triumph to tragedy. *Int J Cell Clon* 1991, 9(6); 548-558

Castagna M, Takai Y, Kaibuchi K, Sano K, Kikkawa U, Nishizuka Y, Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem* 1982, 257(13); 7847-7851

Center for Chronic Disease (CDC), Trends in lung cancer incidence and mortality in the United States, 1980–1987. *JAMA* 1991, 265(4); 448

Chapman HA, Riese, RJ, Shi, GP, Emerging roles für cysteine proteases in human biology. *Annu Rev Physiol* 1997, 59; 63-88

Chauhan SS, Popescu NC, Ray D, Fleischmann R, Gottesman MM, Troen BR, Cloning, genomic organization, and chromosomal localization of human Cathepsin L. *J Biol Chem* 1992, 268(2); 1039-1045

Coulombe R, Grochulski P, Sivaraman J, Ménard R, Mort JS, Cygler M, Structure of human procathepsin L reveals the molecular basis of inhibition by the prosegment. *EMBO J* 1996, 15(20); 5492-5503

Cuzick J, Screening for cancer: future potential. *Eur J Cancer* 1999, 35(5); 685-692

Davis GE, Martin BM, A latent Mr 94,000 gelatin-degrading metalloprotease induced during differentiation of HL-60 promyelocytic leukemia cells. *Cancer Res* 1990, 50(4); 1113-1120

Denhardt DT, Greenberg AH, Egan SE, Hamilton RT, Wright JA, Cysteine proteinase cathepsin L correlates closely with the metastatic potential of H-ras-transformed murine fibroblasts. *Oncogene* 1987, 2; 55-59

Devesa SS, Blot WJ, Fraumeni JF, Declining lung cancer rates among young men and women in the USA: a cohort analysis. *J Natl Cancer Inst* 1989, 81, 1568-1571

Doll R, Hill AB, Mortality in relation to smoking. Ten years observation of British Doctors. *Br Med J* 1964, 1, 1399-1410

Dudjak LA, Cancer metastasis. *Semin Oncol Nurs* 1992, 8(1); 40-50

Engeland A, Andersen A, Haldorsen T, Tretli S, Smoking habits and risk of Cancers other than lung cancer: 28 years follow-up of 26,000 Norwegian men and women. *Cancer Causes Control* 1996, 7(5); 497-506

Engeland A, Bjorge T, Haldorsen T, Tretli S, Use of multiple primary cancers to indicate associations between smoking and cancer incidence: an anlysis of 500,000 cancer cases diagnosed in Norway during 1953-93. *Int J Cancer* 1997, 70(4); 401-407

Ernster VL, Trends in smoking, cancer risk, and cigarette promotion. Current Priorities for reducing tobacco exposure. *Cancer* 1988, 62; 1702-1712

Fidler IJ, Molecular biology of cancer: invasion and metastasis. In: DeVita VT, Hellman S, Rosenberg SA, Cancer: principles & practice of oncology, Lippincott-Raven Publishers 1997, Philadelphia; pp. 135-152

Fidler IJ, Tumor heterogeneity and the biology of cancer invasion and metastasis. Cancer Res 1978, 38; 2651

Fishmann AP, Epidemiology of cancer of the lung. In: Fishmann AP, Pulmonary diseases and disorders. McGraw-Hill, Philadelphia 1988; pp. 1905-1912

Folkman J, How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? Cancer Res 1986, 46; 467-473

Fontana RS, Sanderson DR, Woolner LB, Taylor WF, Miller WE, Muhm JR, Bernatz PE, Payne WS, Pairolero PC, Bergstralh EJ, Screening for lung cancer. A critique of the Mayo Lung Project. Cancer 1991, 67 (Suppl 4); 1155-1164

Freije JP, Balbin M, Abrahamson M, Velasco G, Dalboge H, Grubb A, Lopez-Otin C, Human cystatin D. cDNA cloning, characterization of the escherichia coli inhibitor, and identification of the native protein in saliva. J Biol Chem 1993, 268 (21); 15737-15744

Gal S, Gottesmann M, The major excreted protein of transformed fibroblasts is an activable acid-protease. J Biol Chem 1985, 261(4); 1760-1765

Gazdar AF, Advances in the biology of non-small cell lung cancer. Chest 1986, 89 (Suppl 4); 277S-283S

Gounaris AD, Brown MA, Barrett AJ, Human plasma  $\alpha$ -cysteine proteinase inhibitor. Biochem J 1984, 221; 445-452

Guyton AC, Locomotion of cells. In: Guyton AC, Textbook of medical physiology. WB Saunders 1986, Philadelphia, 7<sup>th</sup> ed.; p. 25

Hamburger AW, Salmon SE, Primary bioassay of human tumor stem cells. Science 1977, 197(4302); 461-463

Hara K, Kominami E, Tsukahara T, Katunuma N, Biosyntheses and processing of lysosomal cysteine proteinases in rat macrophages. FEBS Letters 1988, 231(1), 225-228

Heidtmann HH, Hofmann M, Jacob E, Erbil C, Havemann K, Schwartz-Albiez R, Synthesis and secretion of plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors in cell lines of different groups of human tumors. *Cancer Res* 1989, 49(88), 6960-6965

Heidtmann HH, Salge U, Havemann K, Kirschke H, Wiederanders B, Secretion of a latent, acid activatable Cathepsin L precursor by human non-small cell lung cancer cell lines. *Oncology Res* 1993, 5(10/11); 441-451

Hirasawa K, Nishizuka Y, Phosphatidylinositol turnover in receptor mechanism and signal transduction. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1985, 25; 147-170

Janssen-Heijnen ML, Schipper RM, Klinkhamer PJ, Crommelin MA, Coebergh JW, Improvement and plateau in survival of small-cell lung cancer since 1975: a population-based study. *Ann Oncol* 1998, 9(5); 543-547

Jerala R, Zerovnik E, Kidric J, Turk V, pH-induced conformational transitions of the propeptide of human cathepsin L: a role for a molten globule state in zymogen activation. *J Biol Chem* 1998, 273 (19); 11498-11504.

Jetten AM, George MA, Pettit GR, Rearick JI, Effects of bryostatins and retinoic acid on phorbol ester- and diacylglycerol-induced squamous differentiation in human tracheobronchial epithelial cells. *Cancer Res* 1989, 49(14); 3990-3995

Johnson DA, Barrett AJ, Mason RW, Cathepsin L inactivates  $\alpha_1$ -Proteinase Inhibitor by cleavage in the reactive site region. *J Biol Chem* 1986, 261(31); 14748-14751

Johnson MD, Torri JA, Lippman ME, Dickson RB, The role of cathepsin D in the invasiveness of human breast cancer cells. *Cancer Res* 1993, 53; 873-877

Kabat GC, Aspects of the epidemiology of lung cancer in smokers and nonsmokers in the United States. *Lung Cancer* 1996, 15(1); 1-20

Keller HU, Wilkinson PC, Abercrombie M, Becker EL, Hirsch JG, Miler ME, Scottramsey W, Zigmond SH, A proposal for the definition of terms related to locomotion of leukocytes and other cells. *Clin Exp Immunol* 1977, 27, 377-380

Kerbel RS, Expression of multi-cytokine resistance and multi-growth factor independence in advanced stage metastatic cancer. Malignant melanoma as a paradigm. *Am J Pathol* 1992, 141(3); 519-524

Kilian P, Heidtmann HH, Havemann K, Precision of computer-assisted evaluation of cell migration in the Boyden Assay. *J Comp.-Assist. Microsc* 1993, 5(2), 191-206

Kirschke H, Langner J, Wiederanders B, Ansorge S, Bohley P, Cathepsin L. A new proteinase from rat-liver lysosomes. *Eur J Biochem* 1977, 74; 293-301

Kitten CM, Von Hoff DD, Bennett EV Jr, Grover FL, Growth of lung cancer in a human tumor clonogenic system. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1982, 83(3); 363-371

Klastersky JA, Sculier JP, Intensive chemotherapy of small cell lung cancer. *Lung Cancer* 1989, 5; 196-206

Kornfeld S, Trafficking of lysosomal enzymes in normal and disease states. *J Clin Invest* 1986, 77; 1-6

Kornfeld S, Trafficking of lysosomal enzymes. *FASEB J* 1987, 1; 462-468

Lah TT, Hawley M, Rock KL, Goldberg AL, Gamma-interferon causes a selective induction of the lysosomal proteases, cathepsin B and L, in macrophages. *FEBS Letters* 1995, 363; 85-89

Lamerz R, Dati F, Feller AC, Schnorr G, Tumordiagnostik – Tumormarker bei malignen Erkrankungen. Behringwerke Marburg 1983, S. 48-76

Lester BR, McCarthy JB, Tumor cell adhesion to the extracellular matrix and signal transduction mechanisms implicated in tumor cell motility, invasion and metastasis. *Cancer Metast Rev* 1992, 11; 31-44

Levitt ML, Gazdar AF, Oie HK, Schuller H, Thacher SM, Cross-linked envelope-related markers for squamous differentiation in human lung cancer cell lines. *Cancer Res* 1990, 50(1); 120-128

Lin AY, Ihde DC, Recent developments in the treatment of lung cancer. *JAMA* 1992, 276(12), 1661-1664

Liotta LA, Cancer cell invasion and metastasis. *Sci Am* 1992, 266(2); 54-59, 62-63

Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S, Hart I, Foltz CM, Shafie S, Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature* 1980, 284; 67

Liotta LA, Tumor invasion and metastases – role of the extracellular matrix: Rhoads Memorial Award lecture. *Cancer Res* 1986, 46; 1-7

Maciewicz RA, Wardale RJ, Etherington DJ, Studies on the activation mechanism for the precursor to cathepsin L. *Biochem Soc Trans* 1988, 16; 1056-1057

Maciewicz RA, Wardale RJ, Wotton SF, Duance VC, Etherington DJ, Mode of activation of the precursor to cathepsin L: implication for matrix degradation in arthritis. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 1990, 371; 223-228

Maeno T, Satoh H, Ishikawa H, Yamashita YT, Kamma H, Ohtsuka M, Hasegawa S, Does earlier detection of lung cancer on mass screening improve outcome in younger and middle-age patients? *Oncol Rep* 1998, 5(5); 1217-1219

Mason RW, Green GD, Barrett AJ, Human liver cathepsin L. *Biochem J* 1985, 226, 233-241

Mason RW, Johnson DA, Barrett AJ, Chapman HA, Elastinolytic activity of human cathepsin L. *Biochem J* 1986, 233; 925-927

McQueney MS, Amegadzie BY, D'Alessio K, Hanning CR, McLaughlin MM, McNulty D, Carr SA, Ijames C, Kurdyla J, Jones CS, Autocatalytic activation of human cathepsin K. *J Biol Chem* 1997, 272(21); 13955-13960

Ménard R, Carmona E, Takebe S, Dufour É, Plouffe C, Mason P, Mort JS, Autocatalytic processing of recombinant human procathepsin L. *J Biol Chem* 1998, 273(8), 4478-4484

Minna JD, Pass H, Glatstein E, Ihde DC, Cancer of the lung. In: DeVita V, Hellman S, Rosenberg SA, Principles and practice of oncology, JB Lippincott, Philadelphia, 3<sup>rd</sup> ed.; pp. 591-705

Mountain CF, A new international staging for lung cancer. *Chest* 1986, Suppl; 225S-234S



Müller-Hermelink HK, Müller JG, Ursachen und Eigenschaften von Neoplasien und ihre Bedeutung für die Tumordiagnostik. In: Wilmanns W, Huhn D, Wilms K, Internistische Onkologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York 1994; S.2-25

Mulshine JL, Glatstein E, Ruckdeschel JC, Treatment of non-small cell lung cancer. J Clin Oncol 1986, 4; 1704-1715

Mulvihill JJ, Bale AE, Ecogenetics of lung cancer: genetic susceptibility in the etiology of lung cancer. In: Mizell M, Correa P: Lung cancer: causes and prevention. International lung cancer update conference. New Orleans LA, 1983. Verlag Chemie International, Weinheim 1984; S. 141-152

Niederle N, Heilmann HP, Gatzemeier U, Becker H, Wolf M, Blatter J, Seeber S, Havemann K, Drings P, Schirren J, Vogt-Moykopf I, Bronchialkarzinome. Diagnose und Therapie. Consensus 1993. Lilly GmbH, Gießen, Bereich Onkologie, Saalbugerstraße153, 61350 Bad Homburg

NISHIMURA Y, KATO K, INTRACELLULAR TRANSPORT AND PROCESSING OF LYSOSOMAL CATHEPSIN H. BIOCHEM BIOPHYS RES COMMUN 1987<sup>A</sup>, 148(1); 329-334

Nishimura Y, Kawabata T, Furuno K, Kato K, Evidence that aspartatic proteinase is involved in the proteolytic processing procathepsin L in lysosomes. Arch Biochem Biophys 1989, 271(1); 400-406

Nishizuka Y, Studies and perspectives of protein kinase C. Science 1986, 233(4761); 305-312

Nishizuka Y, The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. Nature 1984<sup>a</sup>, 308(5961); 693-698

Nishizuka Y, Turnover of inositol phospholipids and signal transduction. Science 1984<sup>b</sup>, 225(4668); 1365-1370

Noltenius H, Tumor-Handbuch: Pathologie und Klinik der menschlichen Tumoren. München 1988, Wien, 2. Aufl.; S.691-699

Nomura T, Fujisawa Y, Fujishima A, Characterization and crystallization of recombinant human cathepsin L. Biochem Biophys Res Commun 1996, 228(3); 792-796

Nomura T, Fujisawa Y, Processing properties of recombinant human procathepsin L. *Biochem Biophys Res Commun* 1997, 230(1); 143-146

Paget S, The distribution of secondary in cancers of the breast. *Lancet* 1889, I, 571

Parkinson EK, Emmerson A, The effects of tumour promoters on the multiplication and morphology of cultured human epidermal keratinocytes. *Carcinogenesis* 1982, 3(5); 525-531

Pastor A, Menendez R, Cremades MJ, PastorV, Llopis R, Aznar J, Diagnostic value of SCC, CEA and Cyfra-21.1 in lung cancer: a Bayesian analysis. *Eur Respir J* 1997, 10(3); 603-609

Peterson LL, Zettergren JG, Wüpper KD, Biochemistry of transglutaminases and cross-linking in the skin. *J Invest Dermatol* 1983, 81(Suppl 1); 95S-100S

Poste G, Fidler IJ, The pathogenesis of cancer metastasis. *Nature (Lond.)* 1980, 283; 139-146

Rao CN, Barsky SH, Terranova VP, Liotta LA, Isolation of a tumor cell laminin receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 1983, 111; 804-808

Rawlings ND, Barrett AJ, Families of cysteine peptidases. *Methods In Enzymology* 1994, 244; 461-486

Rawson NSB, Peto J, An overview of prognostic factors in small cell lung cancer. A report from the Subcommittee for the Mangement of Lung Cancer of the United Kingdom Coordination Committee on Cancer Research. *Br J Cancer* 1990, 61; 597-604

Reif AE, Heeren T, Consensus on synergism between cigarette smoke and other environmental carcinogens in the causation of lung cancer. *Adv Cancer Res* 1999, 76; 161-186

Rescheleit DK, Rommerskirch WJ, Wiederanders B, Sequence analysis and distribution of two new human cathepsin L splice variants. *FEBS Letters* 1996, 394; 345-348

Richo GR, Conner GE, Structural requirements of procathepsin D activation and maturation. *J Biol Chem* 1994, 269(20); 14806-14812

Rozhin J, Robinson D, Stevens MA, Lah TT, Honn KV, Ryan RE, Sloane BF, Properties of plasma-membrane associated cathepsin B-like cystein protease in metastatic B16 melanoma variants. *Cancer Res* 1987, 47; 6620-6628

Ruddon RW, Biology of tumor metastasis. In: Ruddon RW, *Cancer biology*, Oxford University Press 1992, New York, Oxford, 2<sup>nd</sup> ed.; pp. 443-467

Rylander R, Environmental tobacco smoke and lung cancer *N Engl J Med* 1990, 323(12); 834

Said JW, Nash G, Sassoon AF, Shintaku IP, Banks-Schlegel S, Involucrin in lung tumors. A specific marker for squamous differentiation *Lab Invest* 1983, 49(5); 563-568

Salge U, Kilian P, Neumann K, Elsässer HP, Havemann K, Heidtmann HH, Differentiation capacity of human non-small-cell lung cancer cell lines after exposure to phorbol ester. *Int J Cancer* 1990, 45; 1143-1150

Santamaría I, Velasco G, Cazorla M, Fueyo A, Campo E, Lopez-Otín C, Cathepsin L2, a novel human cystein protease produced by breast and colorectal carcinomas. *Cancer Res* 1998, 58; 1624-1630

Scanlon EF, James Ewing lecture. The process of metastasis. *Cancer* 1985, 55(6); 1163-1166

Schalhorn A, Sunder-Plassman L, Bronchialkarzinome. In: Wilmanns W, Huhn D, Wilms K, *Internistische Onkologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York 1994; S.490-507

Scoggin CH, Pulmonary neoplasms. In: Wyngaarden JB, Smith LH, Bennet JC, *Cecil Textbook of Medicine*. WB Saunders Philadelphia, London 1992; pt 1, pp 435-441

Sheahan K, Shuja S, Murnane MJ, Cysteine protease activities and tumor development in human colorectal carcinoma. *Cancer Res* 1989, 49; 3809-3814

Shi GP, Munger JS, Meara JP, Rich DH, Chapman HA, Molecular cloning and expression of human alveolar macrophage cathepsin S, an elastinolytic cysteine protease. *J Biol Chem* 1992, 267; 7258-7262

Sloane BF, Rozhin J, Robinson D, Honn KV, Role of cathepsin B and cystatins in tumor growth and progression. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 1990, 371(Suppl); 193-198

Splinter TAW, Response rate as criterion to evaluate chemotherapy in non-small cell lung cancer. Lung cancer 1991, 7; 91-104

Stahel RA, Ginsberg R, Havemann K, Hirsch FR, Ihde DC, Jassem J, Karrer K, Maurer LH, Osterlind K, Van Houtte P, Staging and prognostic factors in small cell lung cancer: a consensus report. Lung Cancer 1989, 5; 119-126

Stanley MA, Crowcroft NS, Quigley JP, Parkinson EK, Responses of human cervical keratinocytes in vitro to tumour promoters and diethylstilboestrol. Carcinogenesis 1985, 6(7); 1011-1015

Statistisches Bundesamt, Todesursachen 1988, Kohlhammer, Stuttgart 1990; S.182

Steppling H, Ferlinz R, Tumoren der Lunge. In: Gross R, Schölmerich P, Gerok W, Die Innere Medizin. Schattauer, Stuttgart, 8., völlig neu bearb. Aufl.; S.436-441

Steward WP, Combination studies with gemcitabine in the treatment of non-small cell lung cancer. Br J Cancer 1998, 78, Suppl 3; 15-19

Storer AC, Ménard R, Catalytic mechanism in Papain familiy of cysteine peptidases. Methods In Enzymology 1994, 244; 486-500

Stracke ML, Liotta LA, Multi-step cascade of tumor cell metastasis. In Vivo 1992, 6(4); 309-316

Sträuli P, Hämmerli G, The role of cancer cell motility in invasion. Cancer Metast Rev 1984, 3, 127-141

Strauss GM, Measuring effectiveness of lung cancer screening: from consensus to controversy and back. Chest 1997, 112 (Suppl 4); 216S-228S

Strauss GM, Prognostic markers in resectable non-small cell lung cancer. Hematol Oncol Clin North Am 1997, 11(3); 409-434

Stryer L, Biochemie. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, New York, korr. Nachdruck 1991 der völlig Neubearb. Aufl. 1990, S.1024

Takahashi H, Ishidoh K, Muno D, Ohwada A, Nukiwa T, Kominami E, Kira S, Cathepsin L activity is increased in alveolar macrophages and bronchoalveolar lavage fluid of smokers. *Am Rev Respir Dis* 1993, 147; 1562-1568

Takeda A, Yamamoto T, Nakamura Y, Takahashi T, Hibino T, Squamous cell carcinoma antigen is a potent inhibitor of cysteine proteinase cathepsin L. *FEBS Letters* 1995, 359; 78-80

Taniguchi S, Nishimura Y, Takahashi T, Baba T, Kato K, Augmented excretion of pro-cathepsin L of a fos-transferred highly metastatic rat cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 1990, 168; 520-526

Tao K, Stearns NA, Dong J, Wu Q, Sahagian GG, The proregion of Cathepsin L is required for proper folding , stability and ER exit. *Arch Biochem Biophys* 1994, 311; 19-27

Tarin D, Metastasis: secondary proliferation in distant organs. In: Puztai L, Lewis CE, Yap E, Cell proliferation in cancer: regulatory mechanisms of neoplastic cell Growth. Oxford University Press 1996, Oxford, New York, Tokyo; pp. 316-341

Terranova VP, Rao CN, Kalebic T, Margulies IMK, Liotta LA, Laminin receptor on human breast carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983, 80; 444-451

Thacher SM, Rice RH, Keratinocyte-specific transglutaminase of cultured human epidermal cells: relation to cross-linked envelope formation and terminal differentiation. *Cell* 1985, 40(3); 685-695

Travis WD, Lubin J, Ries L, Devesa S, United states lung carcinoma incidence trends: declining for most histologic types among males, increasing among females. *Cancer* 1996, 77(12); 2464-2470

Tresch DD, Aronow WS, Smoking and coronary artery disease. *Clin Geriatr Med* 1996, 12(1); 23-32

Tumminello FM, Bernacki RJ, Gebbia N, Leto G, Pepstatins: aspartic protease inhibitors having potential therapeutic applications. *Med Res Rev* 1993, 13(2); 199-208

Turk B, Dolenc I, Lenarcic B, Krizaj I, Turk V, Bieth JG, Björk I, Acidic pH as a physiological regulator of human cathepsin L. *Eur J Biochem* 1999, 259; 926-932

Tylecote FE, Cancer of the lung. Lancet 1927, 2; 256-257

U.S. Government Printing Office, Smoking and health. Washington D.C. 1964

UICC International Union Against Cancer, TNM-Klassifikation maligner Tumoren. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 1987; S. 25

van der Goot FG, Gonzalez-Manas JM, Lakey JH, Pattus F, A „molten globule“ membrane-insertion intermediate of the pore forming colicin A. Nature 1991, 354(6352); 408-410

Vutug C, Kunze M, Prevention of lung cancer: exposure to cigarette tar and lung Cancer risk. In: Georgii A, Solide Tumoren und Metastasierung. 15. Dt. Krebskongreß München 1980. Verhand. d. dt. Krebsgesells., Fischer Verlag, Stuttgart, New York, Bd. 3, S.645ff

Wagener C, Molekulare Onkologie. Entstehung und Progression maligner Tumoren. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York 1999, 2 ., akt. und erw. Aufl.; S.272-279

Walts AE, Said JW, Siegel MB, Banks-Schlegel S, Involucrin, a marker of squamous and urothelial differentiation. An immunohistochemical study on its distribution in normal and neoplastic tissues. J Pathol 1985, 145(4); 329-340

Watt FM, Involucrin and other markers of keratinocyte terminal differentiation. J Invest Dermatol 1983, 81(Suppl 1); 100S-103S

Weber E, Günther D, Laube F, Wiederanders B, Kirschke H, Hybridoma cells producing antibodies to cathepsin L have greatly reduced potential for tumor growth. J Cancer Res Clin Oncol 1994, 120; 564-567

Wells AJ, Heart disease from passive smoking in the workplace. J Am Coll Cardiol 1998, 31(1); 1-9

Wiederanders B, Kirschke H, The processing of cathepsin L precursor in vitro. Arch Biochem Biophys 1989, 272(2); 516-521

Wingo PA, Ries LA, Giovino GA, Miller DS, Rosenberg HM, Shopland DR, Thun MJ, Edwards BK, Annual report to the nation on the status of cancer, 1973-1996, with a special section on lung cancer and tobacco smoking. J Natl Cancer Inst 1999, 91(8); 675-690

Woll PJ, Thatcher N, Bronchus. In: Price P, Sikora K, Halnan KE, Treatment of cancer. Chapman & Hall Medical, London, Glasgow, Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras, Third edition; pp. 437-472

Woodhouse EC, Chuaqui RF, Liotta LA, General mechanisms of metastasis. Cancer 1997, 80(Suppl 8); 1529-1527

World Health Organization, The World Health Organization histological typing of lung tumors. Amer Clin Pathol 1982, 77; 123-136

Yagel S, Warner AH, Nellans HN, Lala PK, Waghorne C, Denhardt DT, Suppression by cathepsin L inhibitors of the invasion of amnion membranes by murine cancer cells. Cancer Res 1989, 49; 3553-3557

Yamaguchi N, Chung SM, Shiroeda O, Koyama K, Imanishi J, Characterization of a cathepsin L-like enzyme secreted from human pancreatic cancer cell line HPC-YP. Cancer Res 1990, 50; 658-663

Yamanishi J, Takai Y, Kaibuchi K, Sano K, Castagna M, Nishizuka Y, Synergistic functions of phorbol ester and calcium in serotonin release from human platelets. Biochem Biophys Res Commun 1983, 122(2); 778-786

Yuspa SH, Ben T, Licht U, Regulation of epidermal transglutaminase activity and terminal differentiation by retinoids and phorbol ester. Cancer Res 1983, 43(12pt.1); 5707-5712

Zhang WM, Leionen J, Kalkkinen N, Dowell B, Stenman UH, Purification and characterization of different molecular forms of prostate-specific antigen in human seminal fluid. Clin Chem 1995, 41; 1567-1573

## TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1.1	WHO-Klassifikation der Lungentumore	10
Tabelle 1.2	Stadienabhängige Therapiestrategien beim NSCLC	12
Tabelle 1.3	Stadienabhängige Resultate unterschiedlicher Therapiestrategien beim SCLC	13
Tabelle 2.1	Differenzierungsmarker von NSCLC-Tumorzelllinien	15
Tabelle 2.2	Charakteristika von Marburger plattenepithelialen NSCLC-Tumor- zelllinien	15
Tabelle 2.3	Differenzierungsmarker Marburger NSCLC-Zelllinien nach PMA- Exposition	17
Tabelle 4.1	Die wichtigsten Typen und Familien der Endopeptidasen	20
Tabelle 4.2	Grundcharakteristika der Kathepsine beim Menschen	21
Tabelle 4.3	Sequenzhomologie um die katalytisch wichtigen Aminosäurepositionen Cys <sup>25</sup> , His <sup>159</sup> , Gln <sup>19</sup> und Asn <sup>175</sup> bei humanen Kathepsinen im Vergleich zum Papain	21
Tabelle 6.1	Verwendete Reagenzien	27
Tabelle 7.1	Medien, Lösungen und Puffer für die Zellkultur	29
Tabelle 7.2	Puffer und Assaylösungen für die fluorometrischen Kathepsin-L- Assays	29
Tabelle 7.3	Puffer und Lösungen für die Aufreinigung des konditionierten Mediums	30
Tabelle 7.4	Puffer und Lösungen für Gelelektrophorese und Western Immunoblot	30
Tabelle 9.1	Vorgehensweise bei der Aufarbeitung des konditionierten Mediums	32
Tabelle 9.2	Pipettierschema für SDS-Elektrophoresegele	35
Tabelle 9.3	Antikörperschema für den Western Immunoblot	35
Tabelle 11.1	Parameter der In-Vitro-Aktivierung von PKatL im Aktivierungsassay	39
Tabelle 11.2	Parameter der In-vitro-Aktivierungsversuche von ProkathepsinL und HLE	39
Tabelle 12.1	Entwicklung der Evaluationsparameter im Verlauf der Aufreinigung	42
Tabelle 12.2	Prozentuale Veränderungen von Volumen, Proteingehalt, KatL- Aktivität und SCCA-Gehalt im Verlauf der Aufreinigung	42
Tabelle 12.3	Modifizierte tabellarische Darstellung der Parameter aus Tabelle 12.1	43
Tabelle 12.4	Bahnenbelegung der SDS-PAGE der PKatL-Endprobe	47
Tabelle 12.5	Bahnenbelegung des Western Immunoblot gegen KatL, spezifischer und Kontrollblot	48



Tabelle 13.1	In-Vitro-Aktivierung von PKatL in unterschiedlichen Relationen zu APu bei unterschiedlichen Vorinkubationszeiten	50
Tabelle 13.2	KatL-Aktivität im Aktivierungsassay unter Variation von Vorinkubationsdauer und Probeneinsatz	51
Tabelle 13.3	KatL-Aktivität im Aktivierungsassay unter Variation von Vorinkubationsdauer und Probeneinsatz	52
Tabelle 13.4	Zusammenfassung der Optimierung des Aktivierungsassay	53
Tabelle 13.5	In-Vitro-Aktivierung von PKatL und HLE bei pH 5,5	54
Tabelle 13.6	In-Vitro-Aktivierung von PKatL und HLE bei Variation der Abfolge im Vorinkubationsansatz	55
Tabelle 13.7	In-Vitro-Aktivierung von PKatL und HLE bei Vorinkubation bei unterschiedlichen pH-Werten in 0,5 molarem HEPES (pH 6,0-7,5)	56
Tabelle 13.8	Zusammenfassung der Ergebnisse des Assay mit HLE im pH-Bereich 6,0-7,5	57
Tabelle 13.9	Bahnenbelegung und Inkubationsbedingungen im Western Immunoblot von PKatL mit PSA, spezifischer und Kontrollblot	59
Tabelle 13.10	Bahnenbelegung und Inkubationsbedingungen im Western Immunoblot von PKatL mit HLE, spezifischer und Kontrollblot	60

## DIAGRAMMVERZEICHNIS

Diagramm 12.1	KatL-Aktivität und Proteingehalt im Aufreinigungsprozeß	44
Diagramm 12.2	Probenvolumen und KatL-Aktivität im Aufreinigungsprozeß	44
Diagramm 12.3	Probenvolumen und Proteingehalt im Aufreinigungsprozeß	45
Diagramm 12.4	Proteingehalt und KatL-Aktivität im G-150-Durchlauf	46
Diagramm 12.5	Proteingehalt und KatL-Aktivität im DE-52-Eluat	46
Diagramm 13.1	In-Vitro-Aktivierung von PKatL in unterschiedlichen Relationen zu APu bei unterschiedlichen Vorinkubationszeiten	50
Diagramm 13.2	KatL-Aktivität im Aktivierungsassay unter Variation von Vorinkubationsdauer und Probeneinsatz	51
Diagramm 13.3	KatL-Aktivität im Aktivierungsassay unter Variation von Vorinkubationsdauer und Probeneinsatz II	52
Diagramm 13.4	In-Vitro-Aktivierung von PKatL und HLE bei pH 5,5	54
Diagramm 13.5	In-Vitro-Aktivierung von PKatL und HLE bei Variation der Abfolge im Vorinkubationsansatz	55
Diagramm 13.6	In-Vitro-Aktivierung von PKatL und HLE bei Vorinkubation bei unterschiedlichen pH-Werten in 0,5 molarem HEPES (pH 6,0-7,5)	56
Diagramm 13.7	In-Vitro-Aktivierung von PKatL und HLE bei Vorinkubation bei unterschiedlichen pH-Werten in 0,5 molarem HEPES (pH 6,2-7,2)	57

## PHOTOVERZEICHNIS

Photo 12.1	SDS-PAGE der PKatL-Endprobe	47
Photo 12.2	Western Immunoblot gegen KatL der PKatL-Endprobe, spezifischer Blot	48
Photo 12.3	Western Immunoblot gegen KatL der PKatL-Endprobe, Kontrollblot	49
Photo 13.1	Western Immunoblot der Inkubation von PKatL mit PSA, spezifischer Blot	59
Photo 13.2	Western Immunoblot der Inkubation von PKatL mit HLE, spezifischer Blot	61

## **VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER UND LEHRER- INNEN**

Meine akademischen Lehrer und Lehrerinnen in Marburg waren die Damen und Herren Arnold, Aumüller, Basler, Bauer, Baum, Beato, Bertalanffy, Engel, Eschenbach, Feuser, Ganz, Geus, Gotzen, Gressner, Griss, Habermehl, Happle, Havemann, Huffmann, Kern, Klenk, Klose, Köhler, Kraus, Krieg, Kroll, Kummer, Lang, Lange, Lennartz, Lorenz, Maisch, Meyer-Breiting, Moosdorf, Neubauer, Oertel, Pohlen, Renschmidt, Riedmiller, Rothmund, Schachtschabel, Schäfer, Schmidt, Schüffel, Schulz, Schwert, Seifart, Seyberth, Siegrist, Stinner, Thomas, von Wichert, Zelder,

## DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich mich zuerst herzlichst beim Betreuer meiner Arbeit, Herrn Professor Dr. Hans-Heinrich Heidtmann für die Überlassung des Themas bedanken. Darüber hinaus habe ich das Bedürfnis mich speziell für seine freundliche und immer zum Zuhören bereite Art und das beharrliche Führen durch die Schwierigkeiten einer experimentellen Promotionsarbeit zu bedanken. Diese Geduld war sicher der entscheidende Faktor für das Gelingen des Vorhabens.

Des weiteren möchte ich mich beim ehemaligen Leiter der Abteilung für Hämatologie, Onkologie und Immunologie des Zentrums für Innere Medizin, Herrn Professor Dr. Klaus Havemann für die Möglichkeit zur Promotion in der von ihm geleiteten Klinik bedanken.

Ein spezielles Dankeschön geht an Frau Dr.rer.nat. Ulla Salge für die gründliche Anleitung beim Erlernen verschiedenster Labormethoden, für die ausführlichen Vortestungen, die Erstellung der verwendeten Prokathepsin-L-Antiseren, die Bereitstellung der HLE-Probe und die vielen kleinen, aber unschätzbar wichtigen Tips bei der Bewältigung der täglichen Laborhürden.

In diesem Zusammenhang wäre alles unglaublich viel schwieriger gewesen ohne die stoisch geduldige Anleitung beim Erlernen des Laboralltags durch Frau Margitta Alt, auf deren fundiertes Können ich jederzeit zählen konnte. Margitta – vielen Dank!

Für die Bereitstellung des Ausgangsmaterials für die Gewinnung von PSA danke ich Herrn Professor Dr.Krause von der Andrologischen Abteilung der Universitäts-Hautklinik in Maburg. Zum Abschluß noch ein riesiges Dankeschön an all die anderen namentlich nicht genannten Mitdoktoranden und MTAs, die hier und dort diese oder jene Hilfe gegeben haben ohne die es manchmal zum Verrücktwerden gewesen wäre!!

Abschließend noch zwei ganz spezielle Danksagungen:

Ohne das unermüdliche Antreiben und kritische Begleiten bei der Verschriftlichung meiner Experimente durch meinen AiP-Kollegen, Mitbewohner und guten Freund Herrn Dr.med. Torsten Vahl wäre diese Arbeit wahrscheinlich nie Wirklichkeit geworden. Sein Anteil an der Fertigstellung kann gar nicht hoch genug eingeschätzt werden. Torsten – vielen Dank!

Das letzte und größte Dankeschön geht an meine Eltern Bärbel und Johannes Weber, denen ich diese Arbeit auch widmen möchte. Die Art wie sie mich immer unterstützt haben, was sie mir ermöglicht haben und was schließlich in dieser Arbeit mündete ist hier sicherlich noch nicht mal ansatzweise adäquat beschreibbar. Diese Worte können nicht ausdrücken wie sehr ich Euch dafür danke!!!

Berlin, im Januar 2001

## LEBENS LAUF

### Persönliche Daten

Name	Weber
Vorname	Klaus
Geburtsdatum/-ort	30.01.1971, Marburg an der Lahn
Anschrift	Jablonskistraße 27, 10405 Berlin

### Schulbildung

08/77-06/81	Grundschule in Schönstadt
08/81-06/83	Gesamtschule Richtsberg in Marburg
08/83-06/90	Martin-Luther-Gymnasium in Marburg

### Zivildienst

10/90-12/91	Universitätsklinikum Marburg, Zentrum für Innere Medizin, Pflege
-------------	--

### Hochschulbildung

seit 04/92	Studium der Humanmedizin, Philipps-Universität Marburg
04/94	Physikum
07/94	Famulatur KKH Frankenberg, Innere Medizin
04/95	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03/96	Famulatur Allgemeinärztliche Praxis, Kyllburg
03/97	Famulatur KH Berlin-Neukölln, Pädiatrie
08/97	Famulatur Universitätsklinikum Marburg, Innere Medizin/ Psychosomatik
04/98	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/98-04/99	Praktisches Jahr Universitätsklinikum Marburg
04/99	DRITTER ABSCHNITT DER ÄRZTLICHEN PRÜFUNG

### AiP

01.06.199-15.10.2000	Medizinische Klinik 1, Klinik für Kardiologie, Angiologie und Pulmologie, Prof.Dr. Bonzel, Klinikum Fulda, Fulda
----------------------	--

16.10.2000-30.11.2000

1.Innere Klinik, Klinik für Kardiologie, Prof.Dr.  
Andresen, Krankenhaus im Friedrichshain, Berlin

### Promotion

Beginn 10/97 experimentelle Arbeit zur Bedeutung der Proteasen PSA und Elastase für die In-vitro-Aktivierung von Prokathepsin L aus Zelllinien nichtkleinzelliger Bronchialkarzinome,  
i.R.d. Promotion wurden Methoden der Proteinaufreinigung (z.B. verschiedene Chromatographieverfahren) und qualitativer Proteinnachweisverfahren (Western Blot, Immunoblot), sowie gängige Verfahren der Zellkultivierung unter Laborbedingungen erlernt

### Weitere Kenntnisse, Hobbies, Sonstiges

Sprachen	sehr gute Sprachkenntnisse in Englisch, Grundkenntnisse in Französisch
EDV	anwendungsorientierte Kenntnisse in allen gängigen Textverarbeitungs- und Grafikprogrammen (WORD, COREL DRAW, EXCEL), sowie in Internetanwendungen und modernen Präsentationstechniken (z.B. PowerPoint-Vorträge)
Hobbies	Langstreckenlauf, Krafttraining, Literatur
Sonstiges	ehemaliger Schulsprecher des Martin-Luther-Gymnasiums Marburg, ehemaliger Vertreter der Zivildienstleistenden am Universitätsklinikum Marburg, ehemaliges studentisches Mitglied des Lehr- und Studiausschusses des Fachbereichs Humanmedizin der Philipps-Universität

## ERKLÄRUNG

Ich erkläre ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Zur In-Vitro-Aktivierung des Prokathepsin L aus der Nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom-Zelllinie EPLC 32 M 1 durch die Serinproteasen Humane Leukozyten-Elastase und Prostata-Spezifisches-Antigen“ im Medizinischen Zentrum für Innere Medizin, Abteilung für Hämatologie, Onkologie und Immunologie unter der ehemaligen Leitung von Herrn Professor Dr. Klaus Havemann (jetziger Leiter: Herr Professor Dr. Andreas Neubauer) mit Unterstützung durch Herrn Professor Dr. Hans-Heinrich Heidtmann ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg, den 03.01.2001